

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISER LA DIFFÉRENCE DE SENSIBILITÉ DES CELLULES BRONCHIOLAIRES ET
ALVÉOLAIRES À LA TOXICITÉ DU CADMIUM CHEZ L'HUMAIN

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

SAUVAGEAU, JOSÉE-ANNE

JANVIER 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord, remercier madame Catherine Jumarie, ma directrice et mon guide pour son soutien constant ainsi que ses judicieux conseils, sans elle, je n'aurais pas pu achever cette recherche. Merci aussi à tous mes professeurs et les différents comités de correction particulièrement, Diana Averill, Louise Brissette et Philip Spear pour leurs commentaires et suggestions tout au long de mes travaux.

Un merci particulier à mes collègues de laboratoire, sans qui les journées auraient été beaucoup plus longues; Amandine Bonet, Vincent Boutin, Sandrine Gautier-Éthier ainsi que Marc Mantha.

Enfin, je tiens à remercier Xavier, ma famille, surtout Laurianne, ainsi que mes amis, de m'avoir écoutée et soutenue tout au long du processus de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ACRONYMES	vi
LISTE DES SYMBOLES	viii
RÉSUMÉ	ix
INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE	1
CHAPITRE I	
ÉTATS DES CONNAISSANCES	3
1.1 À propos du cadmium	3
1.2 Sources et expositions	3
1.3 Toxicocinétique.....	5
1.3.1 Absorption et biodisponibilité.....	5
1.3.2 Distribution et organes d'accumulation	7
1.3.3 Élimination et demi-vie.....	7
1.4 Organes cibles	8
1.4.1 Poumons.....	9
1.5 Mécanismes de toxicité cellulaire	12
1.6 Stress oxydatif.....	14
1.6.1 GSH-GSSG-GPx	16
1.6.2 CAT	17
1.6.3 MT.....	17
1.6.4 HSP70	19
1.6.5 Pgp.....	20
1.7 Métaux protecteurs	21
CHAPITRE II	
OBJECTIFS.....	23

CHAPITRE III	
HYPOTHÈSES	23
CHAPITRE IV	
ARTICLE: CHARACTERIZATION OF A549 AND H441 CELLS' SENSITIVITY TO CD AND ACQUIRED RESISTANCE FOLLOWING CD OR ZN PRE-TREATMENT.	24
4.1 Abstract	25
4.2 Introduction	26
4.3 Materials and methods	28
4.3.1 Cell culture	28
4.3.2 MTT activity measurement.....	28
4.3.3 ¹⁰⁹ Cd uptake measurements	29
4.3.4 RT-PCR	30
4.3.5 GSH content measurements.....	31
4.3.6 Statistical and data analyses	31
4.4 Results	33
4.5 Discussion	36
4.6 Conclusion	40
4.7 References.....	41
4.8 Legends to figures.....	46
4.9 Figures	48
CONCLUSION	56
RÉFÉRENCES.....	60

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
4.1	MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd or Zn for A549 or H441 cells.	48
4.2	Effect of pre-exposure to Cd or Zn on the cellular uptake of ^{109}Cd .	49
4.3	Effect of exposure to Cd or Zn on MT-IIa, HSP70 and MDR1 mRNAs levels in A549 and H441 cells, as measured with RT-PCR showing qualitative results on 2% agarose gel and densitometry analyses of basal and induced mRNA levels.	50
4.4	Effect of exposure to Cd, Zn or BSO on cellular GSH.	51
4.5	Effect of pre-exposure to Cd or Zn on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd on A549 or H441 cells.	52
4.6	Effect of pre-exposure to Cd or BSO alone or in combination with Cd or Zn on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd on A549 or H441 cells.	53
4.7	Effect of pre-exposure to Cd or 3AT alone or in combination with Cd or Zn on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd on A549 or H441 cells.	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Quantité de Cd ingéré en moyenne par les canadiens en µg/jour.	4
4.1	LC ₅₀ values for A549 and H441 cells following different pre-exposure treatments.	55

LISTE DES ACRONYMES

3AT	3-amino-1,2,4-triazole
AAT	Alpha1-antitrypsine
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
ARNm/mRNA	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSO	L-buthionine sulfoximine
Ca	Calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CdCl ₂	Chlorure de cadmium
CdO	Oxyde de cadmium
CdS	Sulfure de cadmium
Cu	Cuivre
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fe	Fer
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
HSP	Protéine de choc thermique
kDa	kilo Dalton
LC ₅₀	Concentration létale 50 %

LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MT	Métallothionéine
MTT	3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
Ni	Nickel
P	Probabilité
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PgP	P-glycoprotéine
ROS	Espèce d'oxygène réactive
RT-PCR	Transcriptase inverse - Réaction en chaîne par polymérase
Se	Sélénium
-SH	Groupelement sulfhydryle
SOD	Superoxyde dismutase
UV	Ultraviolet
ZIP8	<i>8-transmembrane Zn-related ion-related protein</i>
Zn	Zinc

LISTE DES SYMBOLES

LC_{50}	Concentration létale 50 %
Hillslope	Pente de la courbe
SD	Écart-type
Y_{\max}	Valeur de Y maximale
Y_{\min}	Valeur de Y minimale

RÉSUMÉ

Le Cd est un métal hautement toxique, dont les expositions chroniques mènent à des maladies d'obstruction respiratoire, des troubles rénaux ainsi que des désordres osseux. Il est connu que le Cd a pour cible de liaison les groupements thiols des protéines, d'où sa forte affinité au GSH et à la MT. Le Cd peut générer un stress oxydatif possiblement par l'inhibition d'enzymes antioxydantes, telles que la CAT, la SOD, le GR et la GPx, *in vitro* et *in vivo*. L'accumulation de Cd au sein des cellules induit la synthèse de MT qui protège des dommages oxydatifs ou de la toxicité des métaux. Sachant que l'exposition au Cd entraîne une induction de Pgp, de récentes études stipulent que la Pgp serait responsable de l'efflux de Cd après surexpression des gènes de MDR. Pour sa part, le Zn est un métal essentiel capable d'induire le GSH, la HSP70, la SOD ainsi que la MT, et ce, sans induire de stress oxydatif. Le but de cette recherche fut de caractériser la différence de sensibilité des cellules alvéolaires (lignée A549) et bronchiolaires (lignée H441) face au Cd et de comparer leur capacité à développer une résistance au Cd suite à une préexposition au Cd ou au Zn. Les hypothèses sont : i) le Cd induit un déséquilibre redox dans les cellules pulmonaires et celles-ci ont des capacités antioxydantes ainsi que des capacités à exprimer des protéines de stress de réponse immédiate différentes et ii) le Zn est en mesure d'induire une résistance au Cd différente de celle induite par le Cd lui-même. Les résultats de viabilité cellulaire obtenus après exposition de 24 h au Cd indiquent une LC_{50} presque deux fois plus élevée pour les cellules H441 comparativement aux cellules A549 (118 ± 7 vs. $61 \pm 6 \mu M$). Cette différence n'est pas due à une différence d'accumulation intracellulaire du Cd, ni au niveau basal de GSH intracellulaire, mais serait possiblement due au niveau d'ARNm de HSP70 (évalué semi quantitativement) 2,4 fois plus élevé dans les cellules H441 que dans les cellules A549. Cependant, les résultats de viabilité cellulaire obtenus en présence de BSO, un inhibiteur de synthèse de GSH, révèlent que cet antioxydant détient un rôle important dans la résistance basale au Cd dans les deux lignées. La CAT semblerait avoir un rôle plus important dans la résistance basale au Cd dans les cellules A549 que dans les cellules H441, compte tenu des résultats obtenus en présence de 3AT, un inhibiteur de la CAT. Dans les deux lignées, une préexposition de 24 h au Cd ou au Zn n'a pas modifié les niveaux d'accumulation de ^{109}Cd . Une préexposition de 24 h au Cd ($20 \mu M$) a presque doublé la valeur de LC_{50} dans les cellules A549 tandis qu'une préexposition de 24 h au Zn ($40 \mu M$) n'a induit aucune résistance. Inversement, dans les cellules H441, la préexposition de 24 h au Cd ($40 \mu M$) n'a pas eu d'effet, tandis que le Zn ($40 \mu M$) a augmenté la résistance au Cd avec une augmentation de 23% de la LC_{50} . Dans les cellules A549, la HSP70 ainsi que la MDR1 ne sembleraient pas être impliquées dans l'induction de résistance au Cd, par le Cd. Malgré que les cellules H441 soient constitutivement plus résistantes au Cd que les cellules A549, les cellules A549 possèdent une meilleure capacité à développer une résistance que les cellules H441. Nos résultats révèlent ainsi des différences entre résistances basales et acquises entre les deux lignées cellulaires et montrent que les cellules A549 et H441 toutes deux d'origine pulmonaire ne réagissent pas de la même façon, ne développent pas les

mêmes mécanismes de défense et n'expriment pas nécessairement les mêmes niveaux de protéines de stress.

Mots clés : cellules A549, cellules H441, Cadmium, Zinc, tolérance, GSH, MDR1, HSP70, stress oxydatif.

INTRODUCTION ET PROBLÉMATIQUE

C'est dans un monde d'industrialisation qu'un bon nombre de personnes sont soumises à une exposition pulmonaire au cadmium (Cd), un métal que l'on retrouve au sein des industries métallurgiques. L'ingestion et l'inhalation sont les différentes voies d'absorption du Cd chez l'humain. La population générale absorbe le Cd de façon orale, suite aux contaminations des sols et l'entrée du Cd dans la chaîne alimentaire. Les ouvriers ainsi que les populations vivant à proximité des mines ou activités industrielles métallurgiques, quant à eux, sont plutôt soumis à une exposition pulmonaire, tout comme les fumeurs puisque la cigarette contient elle aussi du Cd.

Suivant son absorption dans l'organisme, le Cd peut entraîner une toxicité majeure principalement dans le foie et le rein, qui est en fait l'organe cible, mais aussi au niveau des poumons et des os. Par ailleurs, le Cd est difficilement éliminé de l'organisme puisqu'il possède une demi-vie de 20 ans chez l'homme.

C'est à cause de sa toxicité pulmonaire que le Cd peut entraîner différentes maladies respiratoires telles que l'emphysème, la bronchite chronique et l'œdème pulmonaire. On sait que le Cd peut favoriser le stress oxydatif en générant des radicaux libres de façon indirecte en inhibant certaines enzymes antioxydantes (Beyersmann et Hartwig, 2008), telles que la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPx). De plus, le Cd peut entraîner une baisse de la réserve de glutathion (GSH) et par conséquent engendrer une hausse de radicaux libres.

Par contre, les mécanismes de toxicité impliqués dans l'étiologie de ces maladies sont encore mal connus. Or, au laboratoire de Catherine Jumarie, des recherches ont montré une différence de sensibilité entre les cellules bronchiolaires et alvéolaires face au Cd, cette différence n'étant pas attribuable à des niveaux d'accumulation cellulaire différents. Il est donc important de mieux documenter cette différence de sensibilité phénotypique dans le but de mieux connaître les voies d'entrée du Cd et de mieux comprendre ses mécanismes de toxicité dans les cellules pulmonaires.

De façon générale, après avoir été inhalé, le Cd est distribué à travers l'organisme par le système sanguin, lié en partie à l'albumine. L'accumulation au sein des organes comme les reins, le foie et les poumons est due en majorité à leur forte production de métallothionéine (MT). Les sites de liaison par excellence du Cd sont les groupements thiols des protéines (Moffatt et Denizeau, 1997), la MT possède pour sa part 20 cystéines. Ainsi, la MT protège de la toxicité du Cd en le liant, l'empêchant alors d'aller se lier sur des sites fonctionnels protéiques et d'entraîner des dommages. La P-glycoprotéine (Pgp), quant à elle, pourrait être responsable de l'efflux de Cd, protégeant ainsi les cellules de la toxicité de ce métal (Thevenod *et al.*, 2000). De son côté, la protéine de choc thermique 70 (HSP70) favoriserait une plus grande proportion de Cd lié à la MT en diminuant l'accès aux sites de liaison disulfure des protéines non repliées en les repliant (Stohs et Bagchi, 1995). De ce fait, la HSP70 diminue l'accumulation de protéines mal repliées suivant une liaison au Cd.

Aussi, il ne faut pas oublier que les ouvriers du domaine industriel sont souvent exposés à une panoplie de métaux, les plus utilisés étant le plomb, le zinc, le nickel et à l'occasion le mercure, et que certains peuvent induire une résistance au Cd alors que d'autres peuvent sensibiliser aux effets toxiques du Cd. Afin d'étudier l'induction de résistance ou la sensibilisation au Cd par l'entremise d'autres métaux, il est possible de préexposer les cellules pulmonaires à ces métaux avant de les exposer au Cd.

Ainsi, dans le but de mieux comprendre la toxicité pulmonaire du Cd, nous avons étudié la viabilité cellulaire (mesure d'activité de la MTT) de cellules alvéolaires et bronchiolaires avec et sans préexposition aux métaux (Cd/Zn), fait des mesures semi-quantitatives des niveaux intracellulaires d'ARNm de MT-Ila, de MDR1 (soit la Pgp) et de HSP70 ainsi que des contenus en thiols.

CHAPITRE I

ÉTATS DES CONNAISSANCES

1.1 À propos du cadmium

Le cadmium fait partie des métaux non essentiels, il se retrouve dans l'atmosphère suite aux abrasions et érosions graduelles des rochers et des sols. Les feux de forêts et les éruptions volcaniques contribuent aussi à la présence de Cd dans l'atmosphère (OSHA, 2005). Une haute toxicité à faible dose, une longue demi-vie ainsi qu'un faible taux d'excrétion de l'organisme (OSHA, 2005) sont les caractéristiques permettant au Cd d'avoir de grands impacts sur la santé humaine (Jin *et al.*, 2002 ; USEPA, 2001).

Les intoxications aiguës au Cd sont responsables de dommages au niveau testiculaire, hépatique et pulmonaire (Kasuya *et al.*, 1992), tandis que les expositions chroniques mènent à des maladies d'obstruction respiratoire, comme l'emphysème et la bronchite, des troubles rénaux, une déstabilisation de la pression sanguine, des désordres osseux ainsi qu'une immunosuppression (Jarup *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2004).

Enfin, il faut savoir qu'il n'existe pas à ce jour de traitement efficace pour contrer les dommages causés par une exposition chronique au Cd. Ainsi, même suivant l'arrêt de l'exposition, les dysfonctionnements rénaux et les dommages pulmonaires peuvent continuer à progresser (Bernard, 2008).

1.2 Sources et expositions

Dans les systèmes aquatiques, la quantité de Cd se trouvant dans la colonne d'eau est faible puisque celui-ci se retrouve généralement dans les sédiments ainsi que sur les particules en suspension. À ce jour, le Cd est considéré comme l'un des éléments de contamination des habitats aquatiques les plus importants (Ryan *et al.*, 2000). Dans les environnements non pollués, l'eau de source contient généralement moins de 1 µg de Cd/L (Nordberg *et al.*, 2007).

Dans le sol, on retrouve en moyenne moins de 1 mg de Cd/kg de sol tandis qu'à certains endroits, tels que dans certaines régions du Japon, on retrouve du Cd provenant de la pollution à des concentrations allant jusqu'à 69 mg/kg sol (Nordberg *et al.*, 2007). Le Cd situé dans l'eau ainsi que dans l'air entraîne une hausse de la concentration en Cd dans le sol.

Les précipitations, sous forme de pluie, de Cd dans l'air provenant des activités minières et l'épandage d'engrais et de boues contenant du Cd sur les terres cultivables mènent à la contamination des sols. Cela augmente l'accumulation de Cd dans les récoltes destinées à la consommation humaine (Jarup et Akesson, 2009). Ainsi, le Cd émis dans l'environnement entre dans la chaîne alimentaire.

La nourriture reste la source d'exposition au Cd la plus importante pour la population générale, en plus de la cigarette qui amplifie les dommages (Jarup *et al.*, 1998). Il est intéressant de savoir qu'en moyenne, les européens et américains ingèrent de 10 à 20 µg de Cd/jour. Le tableau 1.1 montre les valeurs moyennes de Cd ingéré par personne par jour au Canada en µg selon Environnement Canada (1994).

Tableau 1.1 : Quantité de Cd ingéré en moyenne par les canadiens en µg/jour

	<i>Air</i>	<i>Eau potable</i>	<i>Nourriture</i>	<i>Sol</i>	<i>Cigarette</i>
<i>Quantité de Cd en µg/jour</i>	0,0231 à 0,091	0,00399 à 0,0357	14,7	0,0112 à 0,0231	3,71

Le Cd est obtenu comme sous-produit du raffinage de zinc (Zn) et d'autres métaux, tels que le cuivre et le plomb (Nordberg *et al.*, 2007). Le Cd est utilisé dans la manufacture de pigments, de stabilisants, d'alliages et de composés électroniques (Liu *et al.*, 2007b ; Liu *et al.*, 2007a). Le Cd est aussi employé dans l'électro galvanisation puisqu'il empêche les produits comportant du fer de rouiller (Taylor *et al.*, 1999). Plus particulièrement, il entre dans la composition des piles rechargeables nickel (Ni)-Cd, d'où l'augmentation de la quantité de Cd dans l'atmosphère suivant la période d'industrialisation (Jarup, 2003). De façon générale, l'air ambiant contient de faibles concentrations de Cd (entre 1 et 50 ng/m³) sous forme de particules en suspension (Nordberg *et al.*, 2007).

Les travailleurs en milieu industriel sont exposés à des quantités qui varient entre 2 et 50 μg de Cd respirable par mètre cube. Cependant, au Canada et aux États-Unis, la limite d'exposition occupationnelle pour le Cd total est de 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ et celle de l'air ambiant est de 2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Nordberg *et al.*, 2007). À l'intérieur de l'environnement de travail, le Cd se trouve majoritairement sous forme d'oxyde (CdO) et de sulfure (CdS) (Oberdorster, 1992).

La cigarette est une autre source d'exposition au Cd puisque les feuilles de tabac accumulent le Cd provenant du sol et de l'environnement. Les quantités élevées de Cd inhalé mènent à des concentrations toxiques dans les poumons majoritairement responsables des intoxications selon certaines études (Tsutsumi *et al.*, 2009). Ainsi, dans la population en générale, les fumeurs seraient les plus exposés, en plus des gens exposés à la fumée secondaire.

1.3 Toxicocinétique

1.3.1 Absorption et biodisponibilité

L'absorption de Cd par la peau est négligeable tandis que 10 à 50% du Cd inhalé et 5 à 10% du Cd ingéré sont absorbés (Nordberg *et al.*, 2007). Le pourcentage de la dose absorbée dans le sang suivant une exposition donnée est nommée biodisponibilité (Reeves et Chaney, 2008). La biodisponibilité orale est donc plus faible que la biodisponibilité pulmonaire.

La solubilité *in vivo* est hautement dépendante de la forme chimique (spéciation) du Cd inhalée, ce qui aura un impact sur la biodisponibilité et les différents types d'effets toxiques subséquents (Oberdorster, 1992). Les dommages aux poumons suivant une inhalation de Cd sont dépendants de la solubilité du composé de Cd *in vivo* (à l'intérieur du poumon). Par exemple, pour obtenir des effets similaires au niveau de l'inflammation des poumons, on doit administrer une dose de chlorure ou d'oxyde de Cd 10 fois plus faible que si l'on administrait une dose de sulfure de Cd (Oberdorster, 1992). L'oxyde de Cd est solubilisé sans difficulté dans les poumons, et ce, fort

probablement en majorité dans les macrophages alvéolaires, ce qui n'est par contre pas le cas pour le sulfure de Cd (Oberdorster, 1992).

Tout dépendant de la taille des particules de Cd dans l'air ambiant, 10 à 50% se déposent dans les alvéoles pulmonaires, tandis que de 90 à 50% du Cd ne se rend pas jusqu'aux alvéoles et demeure dans la muqueuse trachéobronchiale (Nordberg *et al.*, 2007). Les particules moins solubles déposées dans la muqueuse trachéobronchiale sont, quant à elles, transportées au pharynx pour être enfin avalées dans le système gastro-intestinal (Nordberg *et al.*, 2007). On estime qu'une cigarette contient entre 1 à 2 µg de Cd, dont approximativement 10% est inhalé et 50% de ce qui est inhalé est absorbé par les poumons (Jarup et Akesson, 2009).

D'après des études effectuées en laboratoire sur des animaux, l'absorption de Cd par le tractus gastro-intestinal est un mécanisme qui est saturable, mais tant que la saturation n'est pas atteinte la fraction de Cd absorbée, soit la biodisponibilité orale, reste constante (Klaassen *et al.*, 2009). Tout comme pour l'absorption pulmonaire, seule la spéciation, c'est-à-dire la forme chimique du Cd, peut modifier la biodisponibilité orale.

C'est à l'aide de Cd radioactif que différentes études ont montré que l'être humain absorbe approximativement 6% du Cd ingéré (Rahola *et al.*, 1972). Par ailleurs, il est connu que l'incidence d'anémie chez les femmes est plus importante que chez les hommes. Ainsi, les femmes surexpriment le transporteur de fer qui lui-même devient davantage disponible pour le Cd, ce qui explique qu'en moyenne la femme absorbe une plus grande quantité de Cd que l'homme (Akesson *et al.*, 2002 ; Berglund *et al.*, 1994 ; Kippler *et al.*, 2007). De plus, au niveau intestinal, la présence d'autres minéraux semblerait avoir un effet antagoniste sur l'absorption du Cd. Par exemple, une personne possédant des contenus intestinaux élevés de Zn, de fer ou de calcium absorbera moins de Cd (Brzoska et Moniuszko-Jakoniuk, 1998). Inversement, la personne ayant de très faibles taux intestinaux de Zn, de fer ou de calcium absorbera plus de Cd que l'individu moyen. C'est pourquoi il est conseillé pour les individus étant exposés au Cd dans leur alimentation de prendre des suppléments de Ca-Zn-Fe afin de minimiser l'absorption intestinale de Cd. Enfin, la faible quantité de Cd étant en mesure de pénétrer dans les entérocytes y reste trappée et puisque les entérocytes sont renouvelés régulièrement, le

Cd est rapidement éliminé dans les fèces sans avoir été absorbé dans la circulation sanguine (Reeves et Chaney, 2008). Ceci explique la faible biodisponibilité orale du Cd malgré la forte accumulation dans l'épithélium intestinal.

1.3.2 Distribution et organes d'accumulation

Après avoir été absorbé oralement ou par inhalation, le Cd est transporté dans le système sanguin vers les autres parties du corps majoritairement lié à l'albumine ou encore à de grosses protéines du plasma sanguin (Nordberg *et al.*, 2007).

Une fois distribué dans l'organisme, le Cd se loge majoritairement dans les reins, mais aussi dans le foie et les poumons (Bernard, 2008). L'accumulation du Cd à ces endroits est le résultat de la grande production de MT par ces organes. La MT est une protéine inductible par le Cd et qui protège la cellule des dégâts entraînés par ce métal en liant sa forme cationique Cd^{2+} toxique (Bernard, 2008).

Chez les gens soumis à des expositions courantes de Cd, environ 50% du Cd se retrouve dans les reins, 20% dans les muscles ainsi que 15% dans le foie (Kjellstrom *et al.*, 1979). Parallèlement, la proportion de Cd située dans les reins diminue en fonction de la quantité présente dans le foie (Nordberg *et al.*, 2007).

1.3.3 Élimination et demi-vie

Le Cd absorbé lors d'expositions à faibles concentrations sur une longue période n'est que faiblement excrété : par exemple les fèces et l'urine quotidiennes n'évacuent que 0.01 à 0.02% du Cd corporel total (Friberg *et al.*, 1985). Cependant, ce taux d'élimination augmente avec le temps chez les sujets chroniquement exposés au Cd puisque les reins, atteints, sont moins efficaces à réabsorber le Cd filtré puisqu'ils sont saturés en Cd et que de façon générale les systèmes de réabsorption du tubule proximal deviennent inefficaces (insuffisance rénale) (Nordberg *et al.*, 2007). Si par la suite le taux d'exposition diminue ou cesse complètement, les fonctions rénales redeviennent normales et le taux d'excrétion du Cd diminue.

Au sein du corps humain, la demi-vie du Cd est la plus longue dans les muscles, le cortex rénal ainsi que le foie, se situant entre 10 et 30 ans soit de 15 à 40% de la

longévité humaine (Friberg *et al.*, 1985). Dans le sang humain, la demi-vie biologique du Cd distingue deux classes de composés (Kasuya *et al.*, 1992), ceux dits rapides possèdent une demi-vie de 100 jours et la classe des composés plus lents, possédant une demi-vie entre 7 à 16 ans (Jarup *et al.*, 1983).

1.4 Organes cibles

Suivant une exposition chronique au Cd, en milieux de travail ou au sein de la population générale, différents problèmes peuvent être observés dans la fonction rénale (Jarup *et al.*, 1998). Ces problèmes sont souvent considérés comme critiques puisqu'ils sont visibles même suivant de faibles niveaux d'exposition. Chez l'humain, le Cd inhalé et ingéré s'accumule dans les reins, plus particulièrement dans les tubules rénaux. Le dysfonctionnement des reins survient lorsque les taux de Cd tissulaires surchargent la capacité des mécanismes de protection, c'est-à-dire la liaison du Cd à la MT (Nordberg *et al.*, 2007). Divers biomarqueurs de dysfonctionnement rénal ont été établis : parmi ceux-ci la présence d'enzymes provenant des cellules nécrosées du néphron dans l'urine. Par ailleurs, une présence élevée d'albumine, qui est une protéine de grande taille, indique un problème au niveau glomérulaire alors qu'une hausse de N-acétyl-beta-2D-glucosamine dans l'urine, protéine de petite taille, indique plutôt un dommage au niveau tubulaire (Nordberg *et al.*, 2009). Selon une revue de Fowler (2009), le Cd pourrait causer des problèmes au niveau de la vascularisation des reins ce qui entraîne fréquemment des maladies rénales aiguës incurables. De plus, des travaux récents montrent que l'exposition au Cd amplifierait les dommages vasculaires chez les souris susceptibles de développer l'athérosclérose (Knoflach *et al.*, 2011). C'est en augmentant la viscosité du plasma que le Cd entraîne une hausse de la pression sanguine (Kacar Kocak *et al.*, 2010).

Avant d'atteindre la grande circulation, le Cd absorbé oralement ainsi lié à l'albumine ou à la MT arrive au foie par la veine porte et les complexes sont brisés, libérant ainsi le Cd qui causera des dommages aux cellules hépatiques (Nordberg *et al.*, 2007). De plus, cet organe de stockage possède une grande capacité à exprimer divers systèmes antioxydants (Fowler, 2009). Le foie produit des quantités importantes de MT

qui sont ensuite libérées dans la circulation sanguine et ainsi distribuées à travers le corps, dans les reins et autres organes cibles (Nordberg *et al.*, 2007). Ceux-ci produisent aussi de la MT à des niveaux variables.

Depuis plusieurs années maintenant, il est connu que des expositions prolongées à de fortes doses de Cd peuvent entraîner des dommages aux os. C'est durant les années 1950 au Japon, suite à la contamination de rizières par les eaux de surface, que fût observé pour la première fois le syndrome itaï-itaï. Celui-ci se développe suivant une exposition orale prolongée à de hautes concentrations de Cd (ingestion d'environ 200 µg de Cd/jour) (Jarup et Akesson, 2009). Les gens touchés du syndrome itaï-itaï ont des atteintes qui peuvent être sous forme de fractures ou distorsions des os longs, ainsi qu'une combinaison d'ostéomalacie et d'ostéoporose (Jarup et Akesson, 2009). Par ailleurs, l'ostéoporose est aussi visible chez les gens ayant été exposés sur une longue période de temps à de faibles doses de Cd environnemental (Jarup et Akesson, 2009).

1.4.1 Poumons

Les poumons font partie des organes cibles du Cd inhalé, et c'est dans le contexte de toxicité pulmonaire que s'est situé le projet de recherche. La pollution industrielle et la fumée de cigarette sont des sources de Cd inhalé résultant en une accumulation de ce métal à l'intérieur des poumons (Shin *et al.*, 2004). Une fois à l'intérieur du système respiratoire, tout comme dans les autres organes cibles, le Cd semblerait se lier en partie à des protéines de liaison de faibles poids moléculaire, telles que la MT, ce qui protège de la liaison aux protéines fonctionnelles et prévient les effets néfastes ainsi causés (Post *et al.*, 1982).

1.4.1.1 Physiologie du poumon

Le système respiratoire est fait de manière à ce que l'air pénètre dans les narines, passe dans les cavités nasales, ensuite le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches, puis à travers les bronchioles, les bronchioles respiratoires et enfin les conduits alvéolaires et les alvéoles. Les alvéoles sont le siège des échanges gazeux et

sont bordées de différents types de cellules épithéliales. Les pneumocytes de type I recouvrent près de 95% de la paroi alvéolaire. Ces cellules pavimenteuses sont munies de longs prolongements cytoplasmiques et constituent le lieu des échanges gazeux. Ces cellules sont hautement susceptibles d'être touchées par les agents néfastes tels que le NO₂, l'O₃ et le CdCl₂. Ceci est dû en partie à la grande aire de surface de ces cellules, les rendant ainsi plus susceptibles de subir des dommages et d'être desquamées suivant une inhalation de produits toxiques. Les pneumocytes de type II, tels que le modèle cellulaire A549, sont des cellules épithéliales granuleuses qui sécrètent le surfactant. Ces cellules ont la possibilité de se convertir en pneumocytes de type I lorsque ceux-ci périssent (Takano *et al.*, 2002). Le surfactant lui-même est un mélange de phospholipides et de lipoprotéines, telles que SP-A, SP-B, SP-C et SP-D. Le rôle du surfactant est de prévenir l'affaissement des poumons en réduisant la tension superficielle du liquide alvéolaire et ce, en recouvrant la surface interne de l'alvéole exposée à l'air alvéolaire.

La pellicule alvéolaire est constituée d'un groupe de substances et couvre les cellules épithéliales de la voie respiratoire. Cette pellicule contient du surfactant ainsi que de la mucine, de l'acide urique, de l'acide ascorbique, diverses protéines ainsi que du GSH (Ciencewicky *et al.*, 2008).

Les cellules de Clara, telles que le modèle cellulaire H441, quant à elles, se retrouvent dans les bronches et bronchioles. Elles sont aussi des cellules sécrétrices d'une substance qui s'apparente au surfactant, en matière de composition, et qui aurait un rôle dans la protection des bronchioles. Les cellules de Clara sont riches en lysosomes et synthétisent certains composants du surfactant dont les apolipoprotéines SP-A et SP-B, sans toutefois produire de SP-C. Certains croient qu'elles sécrètent un fluide contenant des glycoprotéines de hauts poids moléculaire qui recouvrerait la surface bronchiolaire (Balis *et al.*, 1985). D'autres pensent plutôt que ces cellules phagocytent les toxiques inhalés pour ensuite les dégrader à l'intérieur du grand nombre de lysosomes disponibles (Ohshima *et al.*, 1989).

Par le passé, les cellules A549 furent utilisées pour étudier les voies de signalisation des réponses inflammatoires ainsi que le métabolisme des drogues, les effets du stress oxydatif, l'induction de l'apoptose et la production de surfactant

alvéolaire (Choi *et al.*, 2009 ; Chuang *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2010 ; Hayashi *et al.*, 2010). De plus, les transporteurs présents dans les cellules A549, tels que les canaux à sodium ainsi que le transport de la choline, sont bien caractérisés (Kleinzeller *et al.*, 1994 ; Lazrak *et al.*, 2000). Les cellules H441 ont été employées pour faire des recherches sur les causes et mécanismes de dysfonctionnements pulmonaires, sur les canaux calciques et potassiques, sur la production de surfactant ainsi que pour mener des études sur les voies de signalisation des MAP kinases (Awasthi et King, 2000 ; Thomas *et al.*, 2006 ; Wilson *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2010). Les canaux à sodium ainsi que les pompes ATPase sodium/potassium sont eux-mêmes bien caractérisés dans les cellules H441 (Althaus *et al.*, 2010). Au sein du laboratoire du Dr Jumarie, il a été établi que les cellules A549 (Jumarie, 2002) et H441 (Mantha *et al.*, 2011) accumulent le Cd par transport spécifique, faisant de ces cellules de bons modèles d'étude.

1.4.1.2 Maladies et troubles respiratoires entraînés par le Cd

Lors d'intoxications aiguës par inhalation, les premiers symptômes sont visibles dans les 24 h suivant le contact avec le métal. Ils comprennent de l'irritation et sécheresse du nez et de la gorge, de la toux, des maux de tête, des frissons, de la fièvre et des douleurs à la poitrine. Dans la majorité des cas, il se produit une progression de l'œdème pulmonaire à la pneumonie d'origine chimique allant parfois jusqu'à la mort (Nordberg *et al.*, 2007).

Suivant une exposition à de fortes concentrations de Cd sous forme volatile ou d'aérosol (environ 10 μM de CdCl_2), différents troubles peuvent être observés, par exemple : l'œdème pulmonaire chronique, la bronchite, l'hémorragie, l'inflammation aiguë, la cicatrisation continuelle et possiblement une carcinogenèse (Lin *et al.*, 1998 ; Taylor *et al.*, 1999).

Selon Pearson (2003), une haute dose de Cd (65 nmol dans une solution saline) serait suffisante pour saturer la MT pulmonaire endogène, laissant ainsi le Cd non lié en excès entraîner des effets néfastes, notamment à la vascularisation des poumons.

L'œdème pulmonaire est une maladie qui se manifeste lorsque du plasma sanguin traverse la paroi des capillaires pour se loger dans les alvéoles pulmonaires, ce

qui diminue l'efficacité des échanges gazeux et entraîne ainsi une diminution de l'oxygénation normale du sang. Suivant une exposition à différents toxiques, l'œdème pulmonaire est dû à une modification de la perméabilité des capillaires pulmonaires (Morin *et al.*, 2006). Les traitements dans le but de rétablir l'oxygénation pulmonaire s'effectuent simplement par inhalation d'oxygène.

La bronchite chronique est, de façon concise, une inflammation des bronches et elle se définit par une hypersécrétion bronchique. La bronchite devient « chronique » lorsque la toux et ses expectorations sont subies durant trois mois d'affilée en s'étalant sur deux ans et plus. La pollution, le tabagisme ainsi que les infections à répétition sont les causes majeures de ce problème respiratoire.

Le Cd provoque aussi l'emphysème qui est une affection pulmonaire diffuse causée par un déficit en alpha1-antitrypsine (AAT) dans les poumons. L'AAT est une enzyme inhibitrice par excellence des protéases qui dégradent les protéines non acétylées, telles que la trypsine, la chymotrypsine ainsi que l'élastase, dans le sérum humain. La baisse du niveau d'expression d'AAT entraîne une hausse des dommages tissulaires due à l'élastase des neutrophiles (Stephens et Yew, 2008). Cette maladie se définit par une distension des alvéoles pulmonaires en plus d'un anéantissement de leur paroi. Il existe différents types d'emphysèmes. L'emphysème panlobulaire agit en détruisant les vaisseaux sanguins ainsi que les alvéoles. L'emphysème centrolobulaire, qui est le résultat d'une surconsommation de cigarette suivie d'une bronchite chronique à complication, débute en ne détruisant que les alvéoles. Enfin, le dernier type d'emphysème est le paralésionnel où divers foyers d'emphysème se localisent au sein de cicatrices d'anciens troubles pulmonaires tels que la tuberculose et les pneumoconioses.

À ce jour, très peu d'études sur l'impact des métaux sur les poumons ont été menées sur les lignées cellulaires A549 et H441.

1.5 Mécanismes de toxicité cellulaire

Après avoir atteint les divers tissus cibles, le Cd pénètre dans le milieu intracellulaire à l'aide du transport membranaire par diffusion facilitée grâce à diverses

protéines, c'est-à-dire DMT1 (*divalent metal transporter 1*), les canaux calciques ainsi que ZIP8 (*8-transmembrane Zn-related ion-related protein*) (Klaassen *et al.*, 2009).

Le Cd est un métal cancérigène qui semble interagir avec une multitude de signaux de transduction cellulaire, dont un bon nombre sont en fait associés à la signalisation mitogène (Beyersmann et Hartwig, 2008). Il est clair que le Cd interfère dans les processus de régulation de la prolifération cellulaire à différents niveaux (Beyersmann et Hartwig, 2008). De plus, une étude récente de Guzel *et al.* (2011) a présenté une corrélation entre la concentration de Cd tissulaire ainsi que les marqueurs de dommages oxydatifs selon les grades de cancer de la prostate.

En plus de ses multiples caractéristiques, le Cd est aussi considéré comme un métalloestrogène, tout comme l'aluminium, le nickel, le mercure et le plomb. Les métalloestrogènes sont une nouvelle classe de polluants environnementaux pouvant mimer ou interférer avec l'action de l'œstrogène. En effet, certains ions métalliques auraient la capacité de lier les récepteurs aux œstrogènes, mimant ainsi la réponse à l'œstrogène *in vivo* et *in vitro* (Darbre, 2006). De plus, le Cd serait capable de compétitionner avec l'androgène pour sa liaison à son récepteur, sans modifier son affinité, et d'en mimer les effets. Le résultat est une augmentation de l'expression des gènes régulés par l'androgène, une hausse des réponses androgéniques *in vivo* qui peut être bloquée par un anti androgène (Martin *et al.*, 2002). Certains auteurs ont même découvert un lien entre le Cd et l'infertilité (Wilcox *et al.*, 1999).

Tous les mécanismes de toxicité cellulaire du Cd n'ont toujours pas été élucidés. Cependant, l'hypothèse d'un mode d'action possible serait que le Cd entraîne une inactivation oxydative des ATPases calciques situées dans la membrane plasmique, causant alors une élévation du calcium intracellulaire et une perte de la viabilité cellulaire (Viarengo *et al.*, 1993). Par ailleurs, le Cd semblerait se substituer aux ions calciques dans les systèmes biologiques puisqu'ils possèdent tous deux la même charge et un rayon semblable. Le Cd interférerait de ce fait avec les protéines de transport calciques ainsi que les protéines de signalisation dépendante du calcium (Beyersmann et Hartwig, 2008).

Le Cd ne semble pas être particulièrement génotoxique et ne semble pas entraîner de dommages directs au niveau génétique, il se pourrait donc que des

modifications dans la signalisation cellulaire ou l'inhibition des processus de réparation de l'ADN soient plutôt impliquées comme mécanisme de toxicité du Cd (Liu *et al.*, 2007b). Par ailleurs, d'autres études ont établi que la diminution de la viabilité des cellules pulmonaires suivant une exposition au Cd est due à l'apoptose (Shin *et al.*, 2004).

La cible critique de liaison du Cd se trouve à être les groupements thiols des protéines, un thiol étant un groupement -SH (groupement sulfhydryle). Les groupements -SH sont oxydés par la liaison du Cd^{2+} avide d'électrons. Il est connu que l'inactivation de groupements sulfhydryles de certaines protéines essentielles entraîne une myriade de déficits fonctionnels dans les organelles subcellulaires, telles que le noyau, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Li et Kaplan, 2004).

Malgré le fait que le Cd ne puisse générer de radicaux libres de façon directe à l'intérieur de systèmes biologiques, il a toutefois la capacité de générer un stress oxydatif. On croit que ceci serait effectué par l'inhibition des enzymes antioxydantes, telles que la CAT, la SOD, le GR et le GPx, *in vitro* et *in vivo* (Beyersmann et Hartwig, 2008). De plus, le Cd étant capable de déloger le Fe de divers sites intracellulaires, il peut, par l'entremise de la réaction de Fenton, entraîner la création indirecte de radicaux libres. Ainsi, bien que le Cd ne soit pas un métal Fenton, il augmente la concentration intracellulaire en Fe libre. Le Fe, un métal Fenton, peut alors entrer en contact avec les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) pour générer des radicaux hydroxyles favorisant la peroxydation des lipides suite à un stress oxydatif à la cellule.

1.6 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, et ce, en faveur des oxydants qui mènent potentiellement à des dommages cellulaires (Sies, 1997). Un antioxydant est une substance qui ralentit significativement ou inhibe complètement l'oxydation du substrat (Sies, 1997). Généralement, de faibles concentrations d'antioxydants suffisent pour protéger les cellules.

Le stress oxydatif est étudié comme effet possible du Cd sur les cellules pulmonaires. Selon Li (2008), le stress oxydatif induit par le Cd posséderait un rôle majeur dans les effets néfastes qu'a le Cd sur le développement de l'asthme et de la fibrose kystique et de façon générale, la présence de Cd dans les cellules en culture entraîne une augmentation de l'expression de gènes de stress en partie reliés au stress oxydatif cellulaire tels que la glutathion S-transferase- α et la MT-1 (Hart *et al.*, 1999). Le stress oxydatif peut entraîner la surexpression de protéines de stress dont le rôle est de protéger la cellule contre les différents effets destructeurs et néfastes des oxydants. Parmi ces protéines, les HSP (protéine de choc thermique) et la MT seront décrites plus en détail dans les prochains paragraphes.

Différentes molécules, peptides ou acides aminés intracellulaires possèdent la capacité de lier le Cd une fois dans le corps humain, par exemple : la MT, la cystéine, le GSH, ainsi que certaines protéines riches en thiols. Il semblerait qu'une administration de N-acétylcystéine ou de vitamine E soit suffisante pour prévenir la peroxydation des lipides entraînée par le Cd et protégerait ainsi les reins et le foie des animaux lors d'intoxications (Shaikh *et al.*, 1999).

Mentionnons enfin que certaines études décrivent que, lorsque leurs niveaux sont bien contrôlés, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) auraient une fonction intracellulaire. Plus particulièrement, le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde auraient un rôle dans la signalisation intracellulaire régulant l'expression génétique. Par exemple le peroxyde d'hydrogène est en mesure de modifier l'état de phosphorylation de protéines kinases régulatrices spécifiques, telles que la protéine kinase B (Scandalios, 2005). De plus, le peroxyde d'hydrogène au sein des peroxysomes est un acteur important dans la destruction d'agents pathogènes tels que les bactéries. D'un autre côté, au sein de cellules animales, il a été montré que les radicaux libres bloquent la division cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Paulovich *et al.*, 1997). L'epigallocatechine-3-gallate (EGCG), qui se trouve dans le thé vert, est connue pour ses bénéfices médicaux ainsi que neuroprotecteurs. Une étude récente de Abib (2011) a montré que l'EGCG serait en mesure de protéger les cellules contre les

dysfonctionnements mitochondriaux ainsi que la peroxydation des lipides induits par le Cd, et ce, fort probablement par son activité antioxydante et ses effets chélateurs.

1.6.1 GSH-GSSG-GPx

L'antioxydant par excellence, le GSH, est un tripeptide essentiel contenant un groupement sulfhydryle se retrouvant autant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules. Ce groupement sulfhydryle est celui qui aura une action à l'encontre des oxydants, des composés électrophiliques, des radicaux libres ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Rahman *et al.*, 1995). De plus, le GSH module les réponses inflammatoire et immunitaire (Meister, 1991). Le GSH de l'espace alvéolaire protège un ensemble de cellules du stress oxydatif, dont les macrophages alvéolaires ainsi que les cellules épithéliales alvéolaires, tandis que le GSH sanguin protège les cellules pulmonaires endothéliales (Cross *et al.*, 1994). Le taux de GSH retrouvé dans le fluide pulmonaire est nettement supérieur, au-delà de 100 fois, au taux de GSH dans le plasma (Cross *et al.*, 1994). Ce système de défense face aux oxydants fonctionne de façon à ce que la GPx emploie le GSH comme co-facteur dans le but de détoxiquer les peroxydes. Il est intéressant de savoir que la GPx serait sécrétée par les cellules alvéolaires épithéliales ainsi que les macrophages, au sein de la pellicule alvéolaire, dans le but de maintenir un niveau de défense contre les agents oxydants (Avissar *et al.*, 1996). Le GSH devient alors GSSG (du GSH oxydé) qui est à son tour réduit par la GR dans le but de régénérer du GSH (Rahman *et al.*, 1999). L'expression du GSH intracellulaire est régulée de façon différente suite à une exposition chronique ou aigüe aux agents oxydants, ce qui semblerait être la raison majeure des différences observées dans les niveaux d'accumulation de radicaux libres intracellulaires (Liu *et al.*, 2009).

Certains ont suggéré que les mécanismes de toxicité aigüe du Cd impliqueraient une diminution des réserves de GSH, résultant en une augmentation de radicaux libres qui entraînent à leur tour une augmentation de la peroxydation des lipides et des dommages à l'ADN (Liu *et al.*, 2009). Par ailleurs, malgré que le Cd soit en mesure de lier le précurseur du GSH (γ -Glu-Cys), ce complexe ne semble pas être impliqué dans les premières étapes de détoxification du Cd (Delalande *et al.*, 2010). Dans les cellules A549,

l'ajout de buthione sulfomixine (BSO), un inhibiteur de la synthèse de GSH, entraîne une sensibilité prononcée au Cd (Kang et Enger, 1987) montrant ainsi l'importance du GSH dans la protection cellulaire face au Cd.

1.6.2 CAT

La CAT est majoritairement située à l'intérieur des peroxyosomes, là où se trouvent beaucoup d'enzymes produisant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Scandalios, 2005). La CAT décompose à une vitesse fulgurante le H_2O_2 et peut fonctionner de deux manières. En présence de faibles concentrations de H_2O_2 , différents donneurs d'hydrogène seront oxydés conformément à la réaction suivante $RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$. Si toutefois, les concentrations de H_2O_2 deviennent importantes, la CAT le décompose rapidement suivant la réaction catalytique où le H_2O_2 est transformé en $2H_2O + O_2$ (Scandalios, 2005). La CAT possède un indice de saturation très grand lui permettant de mieux métaboliser de grandes concentrations intracellulaires de H_2O_2 . Les organes contenant de fortes concentrations de CAT, tels que le foie et les reins, possèdent de faibles concentrations endogènes de H_2O_2 , contrairement aux organes possédant de faibles concentrations en CAT, tels que le cœur et les poumons où l'on retrouve des niveaux endogènes de H_2O_2 plus élevés (Scandalios, 2005). De hautes concentrations en H_2O_2 entraînent une hausse de l'activité enzymatique de la CAT à l'intérieur des peroxyosomes (Demple, 1999).

Ainsi, on pourrait croire qu'en présence de Cd, il y aura une augmentation de stress oxydatif, donc une hausse du H_2O_2 et ainsi fort probablement une hausse de l'activité enzymatique de la CAT au sein des cellules.

1.6.3 MT

L'accumulation de Cd à l'intérieur des cellules induit la synthèse de MT et ce, au sein de divers tissus, incluant le foie et les reins chez l'ensemble des mammifères (Conrad *et al.*, 1997). La MT agit comme agent anti radicalaire et protège des dommages oxydatifs ou de la toxicité des métaux (Conrad *et al.*, 2000 ; Klaassen et Liu, 1998).

La MT ne possède pas d'acide aminé aromatique, mais est riche en cystéines, elle en détient 20 (Bell et Vallee, 2009), ce qui lui confère la capacité de lier les cations métalliques à l'intérieur d'un système biologique (Schmitt *et al.*, 2007). Une fois dans le système sanguin, le Cd s'accumule dans les lymphocytes et les globules rouges et se lie préférentiellement à la MT (Hildebrand et Cram, 1979), mais le complexe Cd-MT dominant est formé dans le foie puis ensuite envoyé dans la circulation sanguine pour terminer son parcours dans les reins (Klaassen *et al.*, 1999). La petite taille de la MT, environ 7 kDa (Bell et Vallee, 2009), lui permet d'être filtrée dans la membrane glomérulaire du rein, par la suite, la MT est réabsorbée dans les cellules proximales tubulaires (Nordberg *et al.*, 2007). Il est à noter qu'il en est de même pour le complexe Cd-MT.

D'un autre côté, malgré que la MT ait pour but de protéger les cellules des dommages oxydatifs, il faut savoir que l'accumulation de Cd dans les tissus et sa liaison à la MT contribue à sa longue demi-vie dans le corps humain (Klaassen *et al.*, 2009). La MT intracellulaire est aussi très importante pour diminuer la toxicité du Cd suivant de longues expositions, comme dans le cas des os, des poumons, du foie ainsi que du système immunitaire, mais elle contribue aussi à la néphrotoxicité (Klaassen *et al.*, 2009). En effet, à l'intérieur des lysosomes situés dans les cellules rénales, le Cd se dissocie de la MT et cause ainsi de la néphrotoxicité discrète, mais qui s'accroît avec le temps.

Globalement, la MT peut détoxifier les métaux et protéger contre les oxydants et les électrophiles (Davis et Cousins, 2000). Selon Kang (1989), dans les cellules A549, la MT et le GSH auraient des effets protecteurs additifs pour contrer les méfaits du Cd. C'est pourquoi lors d'expositions chroniques au Cd, de grandes quantités de MT seraient responsables de la résistance à l'apoptose et aux radicaux libres (Somji *et al.*, 2006). Ainsi, l'induction de la MT par le Cd pourrait réduire la réponse apoptotique en diminuant les niveaux intracellulaires de Cd²⁺ libre ainsi que le degré de stress oxydatif à l'intérieur des cellules pulmonaires (Fowler, 2009 ; Shimoda *et al.*, 2003). D'après Hart (2001), la tolérance au Cd développée lors d'une exposition accrue chez un individu ayant été exposé à de faibles concentrations (entre 12,5 et 50 µg de Cd/m³) durant une longue période, serait due à l'augmentation des antioxydants contenant des

groupements thiols, tels que la MT ainsi que le GSH. En effet, une exposition au Cd, comme à la plupart des métaux comme le Zn ou le Cu (Pitt *et al.*, 1997), induit l'expression d'ARNm de MT dans de nombreux tissus (Harley *et al.*, 1989). De plus, il a été observé que, suivant une préexposition à de faibles doses (2.0 mg Cd/kg) de Cd, les animaux devenaient très tolérants au Cd, et ce grâce à l'induction de MT qui protège de la toxicité du Cd (Goering et Klaassen, 1983). Une étude récente a montré que dans les cellules myélomonocytiques de lymphome (U937) le prétraitement des cellules au Cd a induit une résistance significative (Cui *et al.*, 2011), tout comme dans les cellules Caco-2 (Cardin *et al.*, 2009).

De façon générale, il est maintenant bien connu que le Cd induit la synthèse de MT intracellulaire au sein des reins et du foie (Nordberg *et al.*, 2007), cependant l'induction de MT pulmonaire reste très peu étudiée même si ce tissu en exprime. Des études *in vivo* effectuées sur les rongeurs ont dénoté une hausse de MT au sein des tissus pulmonaires suivant une exposition à de faibles concentrations de Cd (1,6 mg de Cd/m³) en aérosols (Hart *et al.*, 1989) ainsi qu'une hausse de MT-I et MT-II suivant une instillation de Cd (Zhao *et al.*, 2009). D'autres études ont montré une hausse de MT pulmonaire suivant une absorption orale de 30 à 120 ppm de Cd dans l'eau chez le rat (Gurel *et al.*, 2007).

En conclusion, la MT est un membre actif dans la lutte contre la toxicité du Cd, non seulement lors d'expositions chroniques, mais aussi lors d'expositions aiguës (Klaassen *et al.*, 2009). Malheureusement, certaines personnes sont génétiquement prédisposées à exprimer de faibles quantités de MT, ce qui les rend ainsi plus susceptibles à la toxicité du Cd (Nordberg, 2004).

1.6.4 HSP70

Suite à un stress environnemental, la cellule active rapidement la « heat shock protein » HSP70 qui fait partie d'une machinerie de protéines chaperon et dont l'activité est modulée par différents cofacteurs (Rujano *et al.*, 2007). La HSP70 est une protéine de 70 kDa dont l'induction est non spécifique puisque la HSP70 peut être activée par une multitude de situations de stress (Wirth *et al.*, 2002). Par exemple, une hausse de la

température de quelques degrés (entre 4° et 8°C), les radiations UV, les agents oxydants ainsi que les solvants organiques sont des stress chimiques et physiques qui peuvent induire la HSP70 (Mayer et Bukau, 2005). En condition normale, la HSP70 est une protéine chaperon qui aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées au sein du cytoplasme. La HSP70 possède en plus un rôle clé dans l'activation de protéines régulatrices spécifiques, dans la régulation de la synthèse de protéines incluant des kinases et dans la dégradation des protéines (Helmbrecht *et al.*, 2000).

Le lien entre la HSP70 et le Cd est le suivant. D'abord, le Cd entraîne un déséquilibre entre la quantité de GSH oxydé et réduit, ensuite, à cause de sa haute affinité aux groupements thiols, il entraîne la formation de liaisons disulfure non natives ce qui amène l'accumulation de protéines mal repliées, entraînant finalement la réponse de choc thermique (Stohs et Bagchi, 1995). La réponse de choc thermique, autrement dit la synthèse de HSP70 ainsi que d'autres HSPs, permet de rétablir la conformation des protéines, éliminant ainsi les sites de liaisons disulfure, laissant le Cd se lier à d'autres molécules telles que la MT.

1.6.5 Pgp

La P-glycoprotéine (Pgp), aussi connue comme une glycoprotéine de perméabilité membranaire ou encore la MDR1 (*multi drug resistance 1*), fait partie de la famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*) qui pompent les molécules à l'extérieur des cellules par un mécanisme ATP-dépendant (Callaghan et Denny, 2002). La surexpression des membres de la famille des transporteurs ABC se fait lors de conditions de MDR (*multidrug resistance*) qui peut être intrinsèque ou acquise. La condition de MDR est acquise lorsque l'on retrouve une surexpression des transporteurs ABC, tels que la Pgp, la protéine de résistance au cancer du sein (ABCG2) et/ou la MRP1 (*multi drug resistance associated protein*). Ensemble, ces pompes à drogues transportent les médicaments à l'extérieur de la cellule, augmentant ainsi la résistance aux xénobiotiques (Chang, 2007). Les transporteurs ABC font la détoxification des cellules et les protègent ainsi contre les toxiques exogènes (Broeks *et al.*, 1996); c'est pourquoi on les retrouve dans les tissus d'absorption majeurs, comme les poumons et

l'intestin, ainsi que dans les tissus impliqués dans le métabolisme et l'élimination tels que le foie et les reins. De plus, les MDR possèdent une fonction de barrière dans plusieurs tissus (Chang, 2007). Une surproduction de Pgp entraîne une augmentation de l'efflux des médicaments, réduisant ainsi leur efficacité (Bellamy, 1996). Des études de distribution d'expression et des analyses fonctionnelles indiquent que la Pgp aurait un effet protecteur contre les toxiques environnementaux (Broeks *et al.*, 1995).

Selon de récentes études, la Pgp se situerait sur la face apicale de l'épithélium bronchial et bronchiolaires ainsi que sur la membrane plasmique des macrophages alvéolaires (Leslie *et al.*, 2005). Il est connu que le Cd détient la capacité d'entrer dans les cellules, possiblement par les canaux calciques ou le système de transport du manganèse (Himeno *et al.*, 2002 ; Tsien *et al.*, 1987). Néanmoins, l'efflux de Cd pourrait résulter d'une expression des gènes de résistance aux drogues (MDR) (Carriere *et al.*, 2011). Diverses études ont déjà observé que dans plusieurs lignées cellulaires, l'exposition au Cd entraîne une induction de Pgp (Huynh-Delerme *et al.*, 2005 ; Thevenod *et al.*, 2000). Parallèlement, il a été observé qu'une inactivation des gènes de MRP1 augmente la sensibilité au Cd (Broeks *et al.*, 1996 ; Tommasini *et al.*, 1996). Cette information suggère que la Pgp ou les pompes de type MDR seraient impliquées dans la protection contre le Cd en facilitant peut-être son excrétion hors de la cellule.

Enfin, au sein de modèles *in vivo*, il n'a toujours pas été démontré si la Pgp joue un rôle dans la protection des poumons suivant une atteinte toxique (Leslie *et al.*, 2005).

1.7 Métaux protecteurs

Certains métaux peuvent contrer les effets du Cd. Par exemple, suite à l'inhalation de CdCl₂, une injection de sélénium (Se) entraînerait une baisse de mortalité chez la souris selon les travaux de Tobias (1946). Le Se aurait son effet protecteur en formant un complexe protéique avec le Cd (Drasch *et al.*, 2005), en plus d'être cofacteur de la GPx (Rotruck *et al.*, 1973). L'effet protecteur du Se agit sur le Cd inhalé une fois absorbé mais aucune donnée n'est disponible sur l'effet protecteur de certains métaux contre le processus d'absorption pulmonaire de Cd comme tel. Ces métaux agiraient

probablement en compétitionnant avec le Cd pour des systèmes de transport membranaires.

Contrairement au Cd, le Zn est un élément essentiel du corps humain. Par ailleurs, le Zn étant un autre métal auquel les gens sont aussi exposés en même temps qu'au Cd, il serait intéressant d'étudier quel serait l'effet d'une préexposition au Zn sur la réponse à une exposition subséquente au Cd. Il est admis que le développement de résistance induite par le Cd se fait en réponse à un déséquilibre redox, ce qui est peu probable dans le cas d'une résistance induite par le Zn. Par exemple, la MT induite par le Cd peut provenir du stress oxydatif ou de la liaison d'un facteur de transcription sur l'élément de réponse aux métaux, tandis que le Zn ne peut l'induire que par cet élément de réponse. Par sa capacité à induire la MT (Formigari *et al.*, 2007), le Zn améliore la protection contre la toxicité du Cd (Klaassen *et al.*, 1999 ; Waalkes, 2003). Il est intéressant de noter que le Cd possède une plus grande affinité pour la MT que le Zn, il peut donc déloger le Zn de la MT induite pour s'y lier lui-même. Le Zn est lui aussi en mesure d'induire le GSH (Nzengue *et al.*, 2011), la HSP70 (Wu *et al.*, 2011) et la SOD (Jihen *et al.*, 2009), protégeant ainsi les cellules. De plus, le Zn favorise l'apoptose de cellules cancéreuses, surexprimant NF- κ B anti-apoptotique, en induisant A20 qui inhibe NF- κ B (Prasad *et al.*, 2009). Par ailleurs, dans les cellules non cancéreuses, le Zn est en mesure d'inhiber certaines endonucléases, inhibant ainsi la mort cellulaire programmée (de la Fuente *et al.*, 2002). C'est pourquoi, dans le cadre de cette étude, les cellules furent préexposées à différentes concentrations de Zn afin de comparer la réponse au Cd et au Zn dans le développement d'une résistance acquise dans les cellules A549 et H441.

CHAPITRE II

OBJECTIFS

Nos objectifs de recherche étaient:

- Caractériser la différence de sensibilité de différents types de cellules pulmonaires face au Cd
- Comparer la capacité d'induction de résistance au Cd suite à une préexposition au Cd ou au Zn dans ces mêmes cellules pulmonaires

CHAPITRE III

HYPOTHÈSES

La première hypothèse stipule que le Cd induit un déséquilibre redox dans les cellules pulmonaires et que celles-ci ont des capacités antioxydantes ainsi que des capacités à exprimer des protéines de stress de réponse immédiate différentes. Cette hypothèse est justifiée par le fait qu'une différence de sensibilité des cellules A549 et H441 au Cd a déjà été établie au sein du laboratoire de Catherine Jumarie.

La seconde hypothèse stipule que le Zn induira une résistance au Cd différente de celle induite par le Cd lui-même. Il est connu que le Zn induit l'expression de MT, ce qui améliorerait la protection contre la toxicité du Cd (Klaassen *et al.*, 1999 ; Waalkes, 2003), cependant, ce métal n'induit pas ou très peu de stress oxydatif comparativement au Cd. Il s'avère donc intéressant de comparer la résistance induite par le Zn à celle d'une préexposition au Cd.

CHAPITRE IV

ARTICLE

Characterization of A549 and H441 cells' sensitivity to Cd and acquired resistance following Cd or Zn pre-treatment.

Josée-Anne Sauvageau, Catherine Jumarie *

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

* To whom it may concern, correspondence should be addressed to:
jumarie.catherine@uqam.ca

** Submitted for publication at Biometals

4.1 Abstract

Cadmium (Cd) is a highly toxic metal that can lead to obstructive pulmonary diseases. The goal of this study was to characterize human alveolar A549 and bronchiolar H441 cells' sensitivity to Cd and capacity to develop a resistance following pre-exposure to Cd or Zn. The LC₅₀ value obtained by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay for H441 cells was twice that obtained for A549 cells (118 ± 7 vs. $61 \pm 6 \mu\text{M}$), a distinction not due to differences in Cd cellular accumulation. The H441 cells' superior resistance is not a consequence of higher glutathione (GSH) levels, but might be due to the 2.4 times higher HSP70 mRNA level compared to A549 cells. Viability measured in the presence of L-buthionine sulfoximine (BSO), a GSH synthesis inhibitor, revealed that GSH is critical for the basal resistance against Cd toxicity in both cell lines. Results obtained with 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), a catalase (CAT) inhibitor, showed that CAT plays a major role in A549 cells' tolerance to Cd whereas H441 cells would have higher anti-oxidant capacities. In both cell lines, a 24 h pre-exposure to Cd or zinc (Zn) did not affect cellular Cd accumulation levels. In A549 cells, pre-exposure to Cd ($20 \mu\text{M}$) almost doubled the LC₅₀ value whereas pre-exposure to Zn ($40 \mu\text{M}$) did not increase cells' tolerance to Cd. Inversely, in H441 cells pre-exposure to Zn ($40 \mu\text{M}$), exclusively, induced a 23% raise in the LC₅₀ value. The Cd-induced resistance in A549 cells would not be related to HSP70 or MDR1. Our results reveal important differences between basal tolerance and induced resistance between both cell lines. A549 and H441 cells may develop redox- and/or non redox-triggered mechanisms of adaptation to Cd, however data extrapolation between these two in vitro models largely used should be avoided.

Keywords: A549 cells, H441 cells, Cadmium, Zinc, Tolerance, GSH, MDR1, HSP70, oxidative stress

Abbreviations: 3AT, 3-amino-1,2,4-triazole; BSO, L-buthionine sulfoximine; CAT, catalase; FBS, Fetal Bovine Serum; GSH, reduced glutathione; GPx, glutathione peroxidase; GSSG, oxidized glutathione; LC₅₀, lethal concentration 50; MDR, multi-drug resistance; MTT, 3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide .

4.2 Introduction

Cadmium (Cd), a highly toxic metal, has various damaging effects on health (Nawrot *et al.*, 2010). It has many industrial uses, but it is mostly used in batteries (Andujar *et al.*, 2010). The main exposure sources to Cd for the general population are food and cigarette smoke. Once absorbed, Cd is transported in blood, bound to metallothionein (MT) and albumin, to different organs where it may accumulate. Its biological half-life is approximately 20 years in humans. Typically, 90% of an inhaled dosage of Cd is absorbed in the lungs (Kundu *et al.*, 2009), where it may induce many chronic obstructive pulmonary diseases (Rennolds *et al.*, 2010). However, mechanisms of Cd toxicity to the lung cells, as well as how these cells may adapt to Cd exposure, remain unknown.

It is known that Cd induces oxidative stress by favoring the production of reactive oxygen species (ROS) (Wang *et al.*, 2004). The Cd-induced increase in ROS level may be due to the displacement of iron and copper from intracellular sites, leading to oxidative stress through Fenton reaction as a result of elevated concentration of Fe^{2+} and Cu^{2+} (Waisberg *et al.*, 2003). Cellular content of glutathione (GSH), an anti-oxidant tripeptide, may also decrease following Cd exposure leading to higher levels of free radicals (Liu *et al.*, 2009). Cadmium can also induce stress proteins, including MT (amongst these, MT-IIa is expressed in lung cells), a metal binding protein, and heat shock protein HSP70 (Harley *et al.*, 1989 ; Stohs et Bagchi, 1995) as well as MDR1, an ATP-dependent membrane transport protein (Huynh-Delerme *et al.*, 2005), and indirectly catalase (CAT) which provides an enzymatic defense against hydrogen peroxide (H_2O_2) toxicity (Scandalios, 2005).

Chronic exposure to low levels of Cd induces resistance to Cd in different cell types, as a result of either higher MT mRNA levels in rat lung epithelial cells or elevated GSH contents in Caco-2 cells (Cardin *et al.*, 2009 ; Lau *et al.*, 2006), or a combination of the two mechanisms with additive effects in A549 cells according to Kang *et al.* (1989). Zn has the ability to induce MT, GSH and HSP70 (Formigari *et al.*, 2007 ; Nzengue *et al.*, 2011 ; Wu *et al.*, 2011) although not through redox processes. Zn can also induce other protective mechanisms not necessarily linked to oxidative stress, including

endonuclease inhibition (de la Fuente *et al.*, 2002). Zn can also increase expression of superoxide dismutase (Jihen el *et al.*, 2009). The fact that Cd and Zn may induce similar as well as completely different protective mechanisms through different pathways should be considered when studying adaptation to metal toxicity.

A549 and H441 cells are two cell lines whose phenotypes have been well characterized, and are both known to accumulate Cd by specific transport mechanisms (Jumarie, 2002 ; Mantha *et al.*, 2011). A549 cells, type II alveolar cells, have been used to study apoptosis induction, the impact of oxidative stress on cells, drug metabolism, cellular accumulation of Cd as well as sensitivity to Cd (Chang, 2007 ; Feng *et al.*, 2010 ; Hayashi *et al.*, 2010 ; Jumarie, 2002 ; Kang *et al.*, 1990). H441 cells, bronchiolar Clara cells, are employed to study mechanisms of pulmonary diseases, surfactant production as well as MAP kinase signaling pathways (Awasthi et King, 2000 ; Thomas *et al.*, 2006 ; Wong *et al.*, 2010).

The aim of the current study was to compare Cd impact on these two cell lines as well as their capacity to adapt to Cd. We have tested the hypothesis that both cell lines develop tolerance to Cd but that Cd- and Zn-induced resistance against Cd toxicity involves different mechanisms in the two cell lines. The role of CAT and GSH was studied and we have tested whether the up-regulation of MT-IIa, HSP70 and MDR1 mRNA expression could be accountable for an acquired resistance. Basal as well as acquired resistance in response to metal pre-exposure were characterized in the two lung cell lines which show strong differences. Our results reveal that H441 cells are twice as resistant to Cd compared to A549 cells. Moreover, pre-exposure to Cd or Zn induced significant resistance to Cd in both cell lines but via different mechanisms of protection.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Cell culture

The cell line A549, obtained from the American Type Culture Collection, was used between passages 82 and 98. The cells were kept in Ham's F12 medium (50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1 mM glutamine. Stock cultures were seeded in 75-cm² culture flasks at 37 °C in a 5% CO₂-95% humidified air atmosphere and were passaged weekly by trypsinization (0.05% trypsin - 0.053 mM EDTA). For all the experiments, cells were seeded at 12×10^3 cells/cm² in 35-mm diameter tissue culture dishes (Corning Inc., Corning, NY, USA) or in 96-well plates (Sarstedt Inc., Montréal, QC, Canada). Cell cultures, which express an ATII-like phenotype (Lieber *et al.*, 1976 ; Smith, 1977), were maintained for 14 days, and the culture medium was changed every 2 days.

The cell line H441, obtained from the American Type Culture Collection, was used between passages 63 and 87. The cells were kept in RPMI 1640 medium (50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin) supplemented with 7.5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1 mM glutamine. Stock cultures were seeded in 75-cm² culture flasks at 37 °C in a 5% CO₂-95% humidified air atmosphere and were passaged weekly by trypsinization (0.05% trypsin - 0.053 mM EDTA). For all the experiments, cells were seeded at 12×10^3 cells/cm² in 35-mm diameter tissue culture dishes (Corning) or in 96-well plates (Sarstedt). Cell cultures, which express a Clara-like phenotype (Bingle et Gitlin, 1993 ; O'Reilly *et al.*, 1989) were maintained for 9 days (cells from older cultures tend to detach from culture ware) and the culture medium was changed every 2 days.

4.3.2 MTT activity measurement

MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used in a colorimetric assay of MTT reduction to a blue formazan product by mitochondrial dehydrogenases of viable cells (Slater *et al.*,

1963). H441 and A549 cells were grown on 96-well plates for 9 and 14 days, respectively, and were rinsed twice with their respective FBS-free culture medium prior to a 24-h incubation (referred to as pre-exposure or pretreatment) in the absence or presence of 20 μM Cd (for A549 cells), 40 μM Cd (for H441 cells), or 40 μM Zn (for both cell lines) (prepared from 100 to 1000X sterile stock solutions in ultra pure water) with or without: 3 mM α -buthionine sulfoximine (BSO) (Sigma) or 100 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) (Sigma). BSO and 3AT inhibit γ -glutamyl cysteine synthase and catalase activities, respectively. The concentrations of inhibitors were chosen for their optimal effect, as determined previously (Cardin *et al.*, 2009). Note that 100 mM 3AT is in the range of concentrations generally used in studies investigating toxicity mechanisms of Cd (Chao et Yang, 2001 ; Chuang *et al.*, 2003).

Following the pre-exposure, cells were incubated in their respective FBS-free culture medium containing increasing concentrations (0–500 μM) of Cd or Zn during another subsequent 24 h (referred to as exposure). Afterward, MTT was added to each well at a final concentration of 1.2 mM (0.5 mg/ml). Cells were incubated for 1 or 2 h (A549 and H441 cells, respectively) at 37 °C, the medium was removed and 0.2 ml of DMSO was added to dissolve the formazan crystals. A Tecan SpectraFluor Plus microplate spectrophotometer (Esbe Scientific Industries Inc., Canada) was used to measure optical density (OD) at 575 nm. MTT data are expressed relative to their respective controls measured in pre-exposed cells (for each pretreatment condition) following a subsequent 24-h incubation in the FBS-free culture medium alone.

4.3.3 ^{109}Cd uptake measurements

H441 and A549 cells were grown for 9 and 14 days, respectively, on 35-mm diameter culture dishes. Cells were maintained for 24 h in their respective FBS-free culture medium in the absence or presence of 20 μM Cd (for A549 cells), 40 μM Cd (for H441 cells) or 40 μM Zn (for both cell lines) and were then exposed to 0.5 μM ^{109}Cd (specific activity between 0.2 and 0.13 $\mu\text{Ci/nmol}$, Eckert & Ziegler, Berlin, Germany) in the absence of unlabeled metals for 24 h at 37°C. Cells were rinsed four times with 2 ml of ice-cold stop solution (PBS) containing 2 mM EDTA. Cells were solubilized in 500 μl 1

N NaOH and the radioactivity was estimated using a Cobra II gamma counter (Canberra Packard, Canada). Cellular proteins were measured according to Bradford (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as the calibration standard, and accumulation levels are expressed as nmol ^{109}Cd per mg of protein.

4.3.4 RT-PCR

H441 and A549 cells were grown for 9 and 14 days, respectively, on 10-cm diameter culture dishes. The cells were then rinsed twice with their respective FBS-free culture medium and incubated for 24 h in the absence or presence of 20 μM Cd (for A549 cells), 40 μM Cd (for H441 cells) or 40 μM Zn (for both cell lines). Total RNA was extracted from the cells using Trizol® Reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) according to the supplier's instructions. The RNA pellets were dried and then dissolved in 50 μl of water treated with 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC) and autoclaved. The purity and concentration of the RNA samples were assessed as described by Bergeron and Jumarie (Bergeron et Jumarie, 2006). Reverse transcription was performed using 2 μg of RNA in a 20 μl total volume, 1 μM random hexamer pd(N)6 (Amersham Biosciences, UK) and the Omniscript® RT Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the supplier's instructions. PCR was conducted with the Taq PCR Core Kit (Qiagen). The sense and antisense primer sequences for β -actin were 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' and 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3' (GenBank NM001101, bases 332-766), 5'-GGATCCCAACTGCTCCTG-3' and 5'-CAGCAGCTGCACTTGTCC-3' for MT-IIa (GenBank BT007315, bases 3-179), 5'-GGCATCGACCTGGGCACCAC-3' and 5'-TCCTTGGTGGCCTGGCGCTG-3' for HSP70 (GenBank NM005345, bases 219-676) and 5'-GCTCCTGACTATGCCAAAGC-3' and 5'-CAATGCTGCAGTCAAACAGG-3' for MDR1 (GenBank AF016535, bases 3099-3498). For β -actin, MT-IIa, HSP70 and MDR1, 40 cycles were used consisting of: denaturation at 94°C for 60 s, annealing at 58°C for 30 s and extension at 72°C for 60 s. The PCR products were separated on 2% (w/v) agarose gel containing 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide and visualized under UV trans-illumination using an LKB 2011 Macrovue Fluorescence system controlled by Alphamager™ 2200 software (Alpha Innotech

Corporation, San Leandro, CA, USA). MT-IIa, HSP70 and MDR1 mRNAs levels were all normalized to that of β -actin.

4.3.5 GSH content measurements

H441 and A549 cells were grown for 9 and 14 days, respectively, on 35-mm diameter culture dishes. Cells were maintained for 24 h in their respective FBS-free culture medium in the absence or presence of 20 μ M Cd (for A549 cells), 40 μ M Cd (for H441 cells), 40 μ M Zn (for both cell lines) or 3 mM BSO (Sigma), used as a GSH synthesis inhibitor. Cells were rinsed three times with 2 ml of ice-cold sodium phosphate buffer 0.1125 M containing 5.6 mM EDTA (pH 8.0). GSH levels were determined using OPT (o-phthalaldehyde) according to the method of Hissin and Hilf (Hissin et Hilf, 1976). Briefly, cells were homogenized on ice using a Polytron homogenizer for 1 min and then centrifuged at 2 000g for 15 min in the presence of HPO_3 (5.3% final concentration). Then, 150 μ l of the supernatant were mixed with 600 μ l of sodium phosphate-EDTA buffer, and 100 μ l of this mixture were incubated with 100 μ l of OPT (Sigma) (100 μ g/100 μ l) for 15 min in a multiwell plate at room temperature. The emitted fluorescence was read at 450 nm following excitation at 340 nm, and GSH content was estimated according to a standard curve. GSH contents are expressed relative to that of protein.

4.3.6 Statistical and data analyses

Unless otherwise specified, results are mean \pm SD estimated on three to twenty-six independent cell cultures, each time in three replicates. Cellular viability as a function of increasing concentrations of Cd was analyzed according to the following concentration-response equation:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC_{50} - X) \times \text{Hillslope}}}$$

where y_{\max} and y_{\min} are the maximal and minimal ratio of cell viability, respectively, and LC_{50} is the concentration of Cd for which a cell viability ratio of 0.5 is observed. The errors associated with the LC_{50} values given in the text represent the standard errors of regression (SER). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA. Stress protein and MDR1 mRNA levels were compared using the unpaired Student's t-test. Nonlinear regression and statistical analysis were performed using Prism and Instat 4 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was assessed at $P \leq 0.05$.

4.4 Results

Following a 24-h exposure to increasing concentrations of Cd (referred to as control conditions) or Zn, the A549 cells were significantly more resistant to Zn compared to Cd, with LC_{50} values of 110 ± 22 and 61 ± 6 μ M, respectively (Fig. 4.1a), whereas H441 cells' sensitivity to Cd and Zn was similar with LC_{50} values of 118 ± 7 and 134 ± 29 μ M respectively (Fig. 4.1b). Interestingly, Figure 4.1 also shows that H441 cells possess a basal resistance to Cd that is significantly superior to that of the A549 cells, i.e. they are 2-fold more resistant.

The uptake of ^{109}Cd was measured to investigate the possibility that H441 cells' higher basal resistance might be related to lower levels of metal accumulation. Figure 4.2 (Ctrl) shows no significant difference in ^{109}Cd uptake between the two cell lines under control conditions suggesting that differences in basal resistance between the cell lines may be attributed to distinct cell protection mechanisms and/or protective protein levels.

Therefore, semi-quantitative RT-PCR analyses were performed to estimate the mRNA levels of MT-IIa, HSP70 and MDR1 (Fig. 4.3a) to verify to what extent they might be responsible for the resistance to Cd. The results show significant differences in the mRNA levels of HSP70 in the two cell lines; with ratio mRNA HSP70/mRNA actin for H441 cells 2.4 times the ratio for A549 cells (Fig. 4.3b, Ctrl). Higher levels of expression of this stress protein could possibly explain, at least partially, the superior basal resistance of H441 cells to Cd. Because of its protective role, the cellular GSH content was evaluated. Basal content was similar in both cell lines with 35.9 ± 11 and 34.4 ± 7 nmol/mg protein in A549 and H441 cells, respectively (Fig. 4.4). Consequently, GSH, MDR1 and MT-IIa contents do not explain the superior basal resistance to Cd of the H441 cells.

As revealed by many studies, pre-exposure of cells to metals can induce the development of a resistance to metals (Klaassen *et al.*, 1999 ; Waalkes, 2003). To compare the capacity to develop resistance to Cd, A549 and H441 cells were pre-exposed for 24 h to their respective LOAEL (5% mortality) (Fig. 4.1) Cd (20 and 40 μ M for A549 and H441 cells, respectively) or Zn (40 μ M for both cell lines) concentration

followed by a 24-h exposure to increasing Cd concentrations. In the case of A549 cells, pre-exposure to Cd induced a significant resistance to Cd as it doubled the LC_{50} value from 61 ± 6 to $118 \pm 33 \mu M$ (Fig. 4.5a). On the other hand, Zn pre-exposure did not affect the LC_{50} value in A549 cells. The opposite was observed for the H441 cells: the pre-exposure to Cd did not induce any resistance, whereas pre-exposure to Zn induced a resistance with a significant 23% increase in the LC_{50} value from 118 ± 7 to $145 \pm 16 \mu M$.

Again, ^{109}Cd uptake was estimated following pre-exposure to either Cd or Zn to verify whether induced resistance was related to lower levels of accumulation compared to control conditions. Figure 4.2 shows that neither pre-exposure to Cd nor to Zn had an impact on ^{109}Cd uptake in either of the two cell lines. Therefore, pre-exposure to Cd or Zn has distinct effects in the two cell lines, which is not the result of differences in accumulation levels.

Consequently, the mRNA levels of MT-IIa, HSP70 and MDR1 were estimated following a pre-exposure to Cd or Zn to determine whether any of these mRNAs were responsible for the induced resistance observed in A549 and H441 cells (Fig. 4.3a). Interestingly, pre-exposure to Cd increased 3- and 4.2-fold the HSP70 and MDR1 mRNA levels, respectively, compared to control conditions in A549 cells. In the same cell line, pre-exposure to Zn led to 2.3- and 3.8-fold higher levels of HSP70 and MDR1 mRNA, respectively (Fig. 4.3b). However, in H441 cells, MDR1 mRNA was the sole to increase: 3.5-fold following pre-exposure to Cd, but not to Zn (Fig. 4.3b).

Because GSH protects against Cd-induced oxidative stress (Wang *et al.*, 2004), cellular GSH levels were evaluated following a 24-h exposure to either Cd, Zn or BSO, an inhibitor of GSH synthesis. Figure 4.4 shows that exposure to Cd induced a significant 71% increase in GSH content in the H441 cells (58.9 ± 9.5 vs. 34.4 ± 7 nmol/mg protein), whereas no effect was noted in A549 cells. Conversely, exposure to Zn did not affect GSH levels in H441 cells, but led to a 35% decrease in the GSH levels in A549 cells (23.2 ± 5 vs. 35.9 ± 11 nmol/mg protein). As expected, exposure to BSO decreased GSH levels in both cell lines. However, a 90% decrease was noted in A549 cells compared to only 62% in H441.

As expected, exposure to BSO in A549 cells led to a 90% decrease in GSH level and also reduced the LC_{50} value by 75%, while in H441 cells, the 62% decrease in GSH level was associated to a 50% decrease in LC_{50} value. Therefore, the lower decrease in LC_{50} value in the H441 cells does not imply that these cells have a better anti-oxidant capacity, but rather that A549 cells are more susceptible to damage from BSO than H441 cells.

The role of GSH in acquired resistance to Cd was further investigated. Figure 4.6a shows that the Cd-induced resistance was lost ($LC_{50} = 15 \pm 1$ and $11 \pm 1 \mu M$ for cells pre-exposed to BSO and to BSO+Cd, respectively). Moreover, BSO alone strongly sensitizes A549 cells to Cd, lowering the LC_{50} value from 61 ± 6 to $15 \pm 1 \mu M$. Although the basal level of GSH does not explain differences in A549 and H441 cells sensitivity to Cd, it is likely that GSH plays a role in basal resistance in A549 cells. As mentioned above, pre-exposure to Cd did not induce resistance in H441 cells, but pre-exposure to BSO sensitized the H441 cells ($LC_{50} = 65 \pm 5$ vs. $118 \pm 7 \mu M$), with higher sensitization following pre-exposure to both Cd and BSO ($LC_{50} 33 \pm 5$ vs. $65 \pm 5 \mu M$ for cells pre-exposed to BSO+Cd and to BSO, respectively) (Fig. 4.6b). This suggests that basal resistance against Cd toxicity depends on basal GSH content in both cell lines. Note that the higher sensitization of A549 cells by BSO (leading to a 75% decrease in the LC_{50} value) compared to H441 cells (for which BSO led to only a 50% decrease in the LC_{50} value) cannot be attribute to higher level of GSH in H441 cells but could be related to the higher efficiency of BSO in lowering GSH content in the A549 cells (Fig. 4.4).

Although Zn did not modify A549 cells' sensitivity to Cd (Fig. 4.5a), it did induce a resistance when the cells were pre-exposed to BSO (Fig. 4.6c). Similarly, the presence of BSO did not prevent the Zn-induced resistance in H441 cells (Fig. 4.6d). A 2-fold increase in the LC_{50} value was measured in A549 cells (28 ± 4 vs. $15 \pm 1 \mu M$ in cells pre-exposed to BSO+Zn and to BSO, respectively) (Fig. 4.6c), and a 64% increase in LC_{50} value was recorded in the H441 cells (107 ± 9 vs. $65 \pm 5 \mu M$ following pre-exposure to BSO+Zn and to BSO, respectively) (Fig. 4.6d). Interestingly, the addition of Zn in the BSO-containing pre-exposure medium led to a LC_{50} value not significantly different compared to the control value. Suggesting that in H441 cells, pre-exposure to Zn is sufficient to recover from damage induced by the inhibition of GSH synthesis.

The role of catalase activity in cellular resistance against Cd toxicity was studied using 3AT, a catalase inhibitor (Fig. 4.7). Pre-exposure to 3AT greatly sensitized A549 cells to Cd, inducing a 61% decrease in the LC_{50} value from 61 ± 6 to 24 ± 3 μ M. The pre-exposure of Cd also induced cellular sensitization relative to cells that were pre-exposed to 3AT alone ($LC_{50} = 11 \pm 1$ vs. 24 ± 3 μ M for cells pre-exposed to 3AT+Cd and to 3AT, respectively) (Fig. 4.7a). Contrary to A549 cells, pre-exposure to 3AT had no effect on sensitivity of H441 cells to Cd. However, pre-exposure to both Cd and 3AT sensitized cells pre-exposed to 3AT alone with a 55% decrease in the LC_{50} value from 117 ± 8 to 52 ± 7 μ M (Fig. 4.7b). The fact that a pre-exposure to 3AT sensitized A549 but not H441 cells suggests a higher antioxidant capacity in the H441 cells which would not be related to higher levels of GSH (Fig. 4.4). Combined pre-exposure to 3AT and Zn did not induce any resistance against Cd toxicity in cells pre-exposed to 3AT alone for both cell lines. Thus, it is reasonable to believe that, in the A549 cells, Zn is unable to counteract the damage induced by catalase inhibition, leading to H_2O_2 accumulation (Fig. 4.7c-d). Note that although 3AT did not sensitize H441 cells, it prevented the Zn-induced increase in cellular resistance to Cd.

Table 4.1 summarizes LC_{50} values obtained in each cell line for each condition tested. Pre-exposure of A549 cells to Cd induced a significant resistance to Cd and increased the LC_{50} to a value similar to that obtained in H441 cells for basal resistance (118 ± 33 and 118 ± 7 μ M for H441 cells and pre-exposed A549 cells, respectively). However, pre-exposure to Cd did not significantly increase the LC_{50} value in H441 cells. Thus A549 cells have a greater ability to develop resistance compared to H441 cells, although any of the pretreatment conditions led to resistance to Cd superior than the basal resistance of H441 cells.

4.5 Discussion

In the current study, we have characterized the resistance capacity for both alveolar (A549) and bronchiolar (H441) cells against Cd toxicity, as well as the ability to develop a resistance to this heavy metal. As a first result, we found that H441 cells are more resistant to Cd than A549 cells, with a LC_{50} value almost twice the value obtained

in the A549 cells (Table 4.1). Other studies have shown similar LC_{50} values (40 and 60 μM) for A549 cells (El Idrissi, 2009 ; Shin *et al.*, 2004), and for H441 cells (120 and 119 μM) (El Idrissi, 2009 ; Papritz *et al.*, 2010). Furthermore, LC_{50} values of 20 μM and 140 μM have been reported following a 48-h and a 24-h exposure to Cd in rat lung epithelial cells and differentiated Caco-2 cells, respectively (Cardin *et al.*, 2009 ; Lau *et al.*, 2006). Overall, sensitivity of A549 and H441 cells to Cd compares quite well with that of other cell types.

Since 24-h accumulation levels of Cd were not different between the two cell lines (Fig. 4.2), the higher basal resistance to Cd observed in H441 cells is likely due to distinct cell protection mechanisms and/or protective protein levels. Cd has the capacity to replace iron and copper in a multitude of proteins, leading to increased cellular levels of free ions which, contrary to Cd, may participate in the Fenton reaction, generating oxidative stress (Casalino *et al.*, 1997 ; Valko *et al.*, 2006). Cells are equipped with many mechanisms to counteract the deleterious effects of oxidative stress, including HSP70 and GSH. Perhaps the fact that H441 cells express more HSP70 (2.4 times) than A549 cells could explain their higher basal resistance to Cd (Fig. 4.3b). Because the two cell lines express similar basal GSH levels, the superior basal resistance of H441 cells to Cd cannot be related to GSH content. The basal GSH content measured in H441 cells in this study (34.3 ± 7.0 nmol/mg protein) is comparable to that of 20 nmol/mg protein reported by O'Donovan *et al.*, (2000) in the same cell line. As for A549 cells, the basal GSH level observed in the current study (35.9 ± 11 nmol/mg protein) is different from the level of 480 nmol/mg protein reported in another study (Mochizuki *et al.*, 2009). The important difference between these GSH levels might be due to the fact that Mochizuki's study was performed on 7-day old cell cultures while the present study was conducted on 14-day old A549 cells. Because A549 cells grow as a monolayer, the exponential growth phase is believed to change for a stationary growth phase once confluency is reached. Indeed a rapid decrease in 3H -thymidine incorporation is measured as a function of days in culture with 41.9, 16.8 and 6.9 pmol/mg protein on days 3, 7 and 14, respectively (unpublished data). Variations in GSH levels in pre- and post-confluent cell cultures has already been shown in Caco-2 cells (Cardin *et al.*, 2009), as well as a function of cell growth stages in A549 cells (Kang *et al.*, 1989).

The capacity of the cell lines to develop resistance to Cd was studied by pre-exposing cells to either Cd or Zn. Pre-exposure to low Cd concentrations led to an increased resistance to a subsequent exposure to Cd (Cardin *et al.*, 2009 ; Jin *et al.*, 1986 ; Kang *et al.*, 1990). Exposure to Zn is known to induce MT, which binds Cd and then reduces its toxic impacts, thus MT has anti-oxidant activities in addition to anti-inflammatory properties (Lin *et al.*, 2010 ; Prasad, 2008 ; Shenkin, 1995). In the present study, pretreatment of cells with either Zn or Cd did not modify MT-IIa mRNA levels in the two cell lines. However, in the case of A549 cells, a pre-exposure to Cd was sufficient to induce a resistance to Cd (LC_{50} values of 61 ± 6 and 118 ± 33 μ M in control and pre-exposed cells, respectively), whereas Zn failed to provide protection (Fig. 4.5a). In contrast, for H441 cells, pre-exposure to Cd did not induce a resistance although Zn did as revealed by a 23% rise in the LC_{50} value (118 ± 7 and 145 ± 6 μ M in control and pre-exposed cells, respectively) (Fig. 4.5b). Thus MT is unlikely responsible for the acquired resistance. Also, pre-exposure to either Cd or Zn did not modify ^{109}Cd accumulation levels in both cell lines (Fig. 4.2).

RT-PCR analysis shows that pre-exposure of H441 cells to Cd increased significantly MDR1 mRNA levels although it did not induce any resistance to Cd (Fig. 4.3). Furthermore, pre-exposure to Zn, which induced a resistance, did not affect any of the mRNA levels under study. These results preclude a main role for MDR1 in the induced resistance capacity in H441 cells; other mechanisms and/or stress proteins are likely involved in this process. Pre-exposure of A549 cells to Cd induced a resistance as well as an increase in HSP70 and MDR1 mRNA levels, but pre-exposure to Zn also increased these mRNA levels without inducing resistance. Consequently, it seems that HSP70 and MDR1 are not necessarily responsible for the Cd-induced resistance in A549 cells. Another interesting point revealed when comparing mRNA induction levels in the two cell lines is that A549 cells have a superior adaptation capacity to H441 cells. However, although higher levels of HSP70 and MDR1 mRNA induction are observed in A549 cells following pre-exposure to Cd or Zn (Fig. 4.3), leading to similar mRNA levels compared to unexposed control cells H441 (data not shown), the A549 cells never become more resistant than H441 cells.

Previous studies have shown that a 24-h exposure to 10 μ M Cd induces a 65% increase in thiol content in the Caco-2 cells (Cardin *et al.*, 2009). Similar results were obtained in H441 cells for which a 71% increase in GSH level was recorded whereas exposure to Cd did not affect GSH content in A549 cells (Fig. 4.4). Interestingly, despite the fact that GSH levels did not change in A549 cells, these cells developed a resistance to Cd following a pre-exposure to Cd. In contrast, pre-exposure of H441 cells to Cd did not induce a significant resistance, but did increase GSH cellular level. Moreover, pre-exposure to Zn diminished GSH levels without modifying the LC₅₀ values in A549 cells, and had no impact on GSH levels in H441 cells, but induces a significant resistance to Cd. Thus GSH is not responsible for the induced resistance to Cd for these cell lines.

As expected, exposure to BSO induced a significant decline in GSH cellular contents as well as decreases in the LC₅₀ values in both cell lines (Fig. 4.6). This suggests that GSH plays a role in the basal cellular resistance, although other parameters would explain the difference in sensitivity observed between the two cell lines. Importantly, pre-exposure to a mixture of BSO and Cd amplified sensitization of H441 cells compared to pre-exposure to BSO alone. In contrast, pre-exposure to a mixture of BSO and Zn induced a significant resistance to Cd compared to pre-exposure to BSO alone in both cell lines. Zn even prevented the deleterious effects of BSO in H441 cells. This is particularly interesting considering that, in A549 cells, exposure to Zn alone induced a significant decrease in GSH content and increased HSP70 and MDR1 mRNA levels without modifying the LC₅₀ value. Why Zn alone did not increase resistance of A549 cells against Cd toxicity but did succeed in increasing the LC₅₀ value in the presence of BSO deserves to be further investigated. Although, this suggests that Zn-induced adaptation mechanisms would be operational in the absence of GSH synthesis.

Catalase plays a critical role in cellular protection against Cd-induced oxidative stress and 3AT, a catalase inhibitor, sensitized A549 cells to Cd, but not H441 cells (Fig. 4.7). The higher HSP70 mRNA level in H441 cells could be responsible for a higher tolerance to pro-oxidant conditions compared to A549 cells. A combined pre-exposure to 3AT and Cd sensitized both cell lines, which is in accordance with the fact that Cd induces oxidative stress (Wang *et al.*, 2004). A combined pre-exposure to 3AT and Zn did not lead to higher cellular sensitization to Cd compared to 3AT: contrary to Cd, Zn

does not induce ROS production. Note that in contrast to what has been observed with a co-exposure to BSO and Zn, Zn failed to induce resistance in A549 cells exposed to 3AT, even if treatment with 3AT did not sensitize cells to Cd as much as did BSO ($LC_{50} = 24 \pm 3$ vs. $15 \pm 1 \mu M$ in cells pre-exposed to 3AT and BSO, respectively).

4.6 Conclusion

The results of this study show that A549 cells are twice as sensitive to Cd compared to H441 cells. Higher levels of HSP70 mRNA, but not GSH, could be responsible, at least in part, for the higher basal resistance of H441 cells. However, GSH plays a critical role in basal resistance in each cell line. Pro-oxidant conditions clearly sensitize cells to Cd, and higher anti-oxidant capacities not related to intracellular GSH content or CAT activity (possibly selenium or ascorbic acid levels or SOD activity) are suspected in H441 cells, which remain insensitive to catalase inhibition. Pre-exposure to Cd or Zn induces resistance to Cd with marked differences between the two cell lines. Increased cellular GSH content would not be responsible for the acquired resistance to Cd. Pre-exposure conditions to either Cd or Zn may increase HSP70 and MDR1 mRNA levels but such increases are not prerequisite to higher cellular resistance. Cd-induced mechanisms of adaptation dominate in A549 cells, whereas the H441 cells only develop resistance with Zn stimulation. Because of their lower anti-oxidative capacity, the A549 cells, but not H441 cells, would swiftly respond to pro-oxidant stimulation. A549 and H441 cells may develop redox- and/or non redox-triggered mechanisms of adaptation to Cd, however data extrapolation between these two widelyused in vitro models should be avoided.

4.7 References

- Andujar P, Bensefa-Colas L, Descatha A (2010) Acute and chronic cadmium poisoning. *Rev Med Interne* 31 (2):107-115. doi:10.1016/j.revmed.2009.02.029
- Awasthi V, King RJ (2000) PKC, p42/p44 MAPK, and p38 MAPK are required for HGF-induced proliferation of H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279 (5):L942-949
- Bergeron PM, Jumarie C (2006) Reciprocal inhibition of Cd(2+) and Ca(2+) uptake in human intestinal crypt cells for voltage-independent Zn-activated pathways. *Biochim Biophys Acta* 1758 (6):702-712. doi:S0005-2736(06)00168-4 [pii]
- Bingle CD, Gitlin JD (1993) Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene. *Biochem J* 295 (Pt 1):227-232
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cardin GB, Mantha M, Jumarie C (2009) Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biometals* 22 (5):753-769. doi:10.1007/s10534-009-9223-6 [doi]
- Casalino E, Sblano C, Landriscina C (1997) Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 346 (2):171-179. doi:10.1006/abbi.1997.0197
- Chang XB (2007) A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 26 (1):15-37. doi:10.1007/s10555-007-9041-7 [doi]
- Chao JI, Yang JL (2001) Alteration of cadmium-induced mutational spectrum by catalase depletion in Chinese hamster ovary-K1 cells. *Mutat Res* 498 (1-2):7-18. doi:S1383571801002492 [pii]
- Chuang SM, Wang IC, Hwua YS, Yang JL (2003) Short-term depletion of catalase suppresses cadmium-elicited c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis: role of protein phosphatases. *Carcinogenesis* 24 (1):7-15
- de la Fuente H, Portales-Perez D, Baranda L, Diaz-Barriga F, Saavedra-Alanis V, Layseca E, Gonzalez-Amaro R (2002) Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells. *Clin Exp Immunol* 129 (1):69-77
- El Idrissi L (2009) Cytotoxicité du cadmium, du plomb et du mercure et caractérisation du transport membranaire de cadmium dans les cellules alvéolaires (A549) et bronchiolaires (H441). Thèse (M. en biologie) --Université du Québec à Montréal, 2009., Montréal

- Feng T, Yunfeng N, Jinbo Z, Zhipei Z, Huizhong Z, Li L, Tao J, Yunjie W (2010) Single immunoglobulin IL-1 receptor-related protein attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in A549 cells. *Chem Biol Interact* 183 (3):442-449. doi:10.1016/j.cbi.2009.11.022
- Formigari A, Irato P, Santon A (2007) Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146 (4):443-459. doi:10.1016/j.cbpc.2007.07.010
- Harley CB, Menon CR, Rachubinski RA, Nieboer E (1989) Metallothionein mRNA and protein induction by cadmium in peripheral-blood leucocytes. *Biochem J* 262 (3):873-879
- Hayashi S, Sakurai H, Hayashi A, Tanaka Y, Hatashita M, Shioura H (2010) Inhibition of NF-kappaB by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 25 (1):81-87
- Hissin PJ, Hilf R (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74 (1):214-226
- Huynh-Delerme C, Huet H, Noel L, Frigieri A, Kolf-Clauw M (2005) Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium. *Toxicol In Vitro* 19 (4):439-447. doi:S0887-2333(04)00127-4 [pii]
- Jihen el H, Imed M, Fatima H, Abdelhamid K (2009) Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 72 (5):1559-1564. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.006
- Jin T, Nordberg GF, Nordberg M (1986) Uptake of cadmium in isolated kidney cells--influence of binding form and in vivo pretreatment. *J Appl Toxicol* 6 (6):397-400
- Jumarie C (2002) Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat ATII and the human A549 cells. *Biochim Biophys Acta* 1564 (2):487-499
- Kang YJ, Clapper JA, Enger MD (1989) Enhanced cadmium cytotoxicity in A549 cells with reduced glutathione levels is due to neither enhanced cadmium accumulation nor reduced metallothionein synthesis. *Cell Biol Toxicol* 5 (3):249-259
- Kang YJ, Nuutero ST, Clapper JA, Jenkins P, Enger MD (1990) Cellular cadmium responses in subpopulations T20 and T27 of human lung carcinoma A549 cells. *Toxicology* 61 (2):195-203
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S (1999) Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:267-294. doi:10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267 [doi]

- Kundu S, Sengupta S, Chatterjee S, Mitra S, Bhattacharyya A (2009) Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach. *J Inflamm (Lond)* 6:19. doi:10.1186/1476-9255-6-19
- Lau AT, Zhang J, Chiu JF (2006) Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 215 (1):1-8. doi:10.1016/j.taap.2006.01.011
- Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17 (1):62-70
- Lin YS, Caffrey JL, Chang MH, Dowling N, Lin JW (2010) Cigarette smoking, cadmium exposure, and zinc intake on obstructive lung disorder. *Respir Res* 11:53. doi:1465-9921-11-53 [pii]
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB (2009) Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 238 (3):209-214. doi:S0041-008X(09)00070-2 [pii]
- Mantha M, El Idrissi L, Leclerc-Beaulieu T, Jumarie C (2011) Fe- and Zn-induced inhibition of Cd uptake in human lung cell lines: speciation studies with H441 and A549 cells. *Toxicol In Vitro*
- Mochizuki H, Todokoro M, Arakawa H (2009) RS virus-induced inflammation and the intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells. *Inflammation* 32 (4):252-264. doi:10.1007/s10753-009-9128-0
- Nawrot TS, Staessen JA, Roels HA, Munters E, Cuypers A, Richart T, Ruttens A, Smeets K, Clijsters H, Vangronsveld J (2010) Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals* 23 (5):769-782. doi:10.1007/s10534-010-9343-z
- Nzengue Y, Candeias SM, Sauvaigo S, Douki T, Favier A, Rachidi W, Guiraud P (2011) The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: Its redox biomarkers. *J Trace Elem Med Biol*. doi:10.1016/j.jtemb.2011.06.002
- O'Donovan DJ, Katkin JP, Tamura T, Smith CV, Welty SE (2000) Attenuation of hyperoxia-induced growth inhibition in H441 cells by gene transfer of mitochondrially targeted glutathione reductase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22 (6):732-738
- O'Reilly MA, Weaver TE, Pilot-Matias TJ, Sarin VK, Gazdar AF, Whitsett JA (1989) In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors. *Biochim Biophys Acta* 1011 (2-3):140-148
- Papritz M, Pohl C, Wubbeke C, Moisch M, Hofmann H, Hermanns MI, Thiermann H, Kirkpatrick CJ, Kehe K (2010) Side-specific effects by cadmium exposure: apical

- and basolateral treatment in a coculture model of the blood-air barrier. *Toxicol Appl Pharmacol* 245 (3):361-369. doi:S0041-008X(10)00129-8 [pii]
- Prasad AS (2008) Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontol* 43 (5):370-377. doi:10.1016/j.exger.2007.10.013
- Rennolds J, Butler S, Maloney K, Boyaka PN, Davis IC, Knoell DL, Parinandi NL, Cormet-Boyaka E (2010) Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells. *Toxicol Sci* 116 (1):349-358. doi:10.1093/toxsci/kfq101
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38 (7):995-1014. doi:S0100-879X2005000700003 [pii]
- Shenkin A (1995) Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support. *Nutrition* 11 (1 Suppl):100-105
- Shin H-J, Lee B-H, Yeo MG, Oh S-H, Park J-D, Park K-K, Chung J-H, Moon C-K, Lee M-O (2004) Induction of orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and its role in cadmium-induced apoptosis in lung. *Carcinogenesis* 25 (8):1467-1475. doi:10.1093/carcin/bgh135
- Slater TF, Sawyer B, Strauli U (1963) Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochimica et Biophysica Acta* 77:383-393
- Smith BT (1977) Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function. *Am Rev Respir Dis* 115 (2):285-293
- Stohs SJ, Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18 (2):321-336. doi:089158499400159H [pii]
- Thomas KH, Meyn P, Suttorp N (2006) Single nucleotide polymorphism in 5'-flanking region reduces transcription of surfactant protein B gene in H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291 (3):L386-390. doi:00193.2005 [pii]
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160 (1):1-40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009
- Waalkes MP (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 533 (1-2):107-120. doi:S0027510703002112 [pii]
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192 (2-3):95-117
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM (2004) Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36 (11):1434-1443. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.010

- Wong PS, Vogel CF, Kokosinski K, Matsumura F (2010) Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42 (2):210-217. doi:10.1165/rcmb.2008-0228OC
- Wu C, Zhang W, Mai K, Xu W, Zhong X (2011) Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 154 (1):1-6. doi:10.1016/j.cbpc.2011.03.003

4.8 Legends to figures

Figure 4.1. MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd or Zn for a) A549 or b) H441 cells. Cells were cultured in presence of FBS for 14 or 9 days and were exposed for 24 h to increasing concentrations of Cd or Zn in the culture medium in the absence of FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 8 to 12 independent cell cultures.

Figure 4.2. Effect of pre-exposure to Cd or Zn on the 24-h cellular uptake of $0.5 \mu\text{M}$ ^{109}Cd . A549 and H441 cells were cultured in presence of FBS for 13 or 8 days, respectively, and were then exposed for 24 h to $20 \mu\text{M}$ Cd (H441 cells), $40 \mu\text{M}$ Cd (A549 cells) or $40 \mu\text{M}$ Zn (H441 and A549 cells) in the absence of FBS. "Ctrl" refers to a 24-h FBS-free period of culture without treatment. Data shown are means \pm SD estimated on 3 independent cell cultures.

Figure 4.3. Effect of exposure to Cd or Zn on MT-IIa, HSP70 and MDR1 mRNAs levels in A549 and H441 cells, as measured with RT-PCR showing a) qualitative results on 2% agarose gel and b) densitometry analyses of basal (left y axis) and induced (right y axis) mRNA levels. H441 and A549 cells were cultured in presence of FBS for 8 or 13 days, respectively, and were then exposed for 24 h to $20 \mu\text{M}$ Cd (H441 cells), $40 \mu\text{M}$ Cd (A549 cells) or $40 \mu\text{M}$ Zn (H441 and A549 cells) in the absence of FBS. "Ctrl" refers to culture medium without FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 4 to 5 independent cell cultures. * Significant differences ($P \leq 0.05$) compared to control mRNA level in the same cell line. ♦ Significant differences ($P \leq 0.05$) between the two cell lines.

Figure 4.4. Effect of exposure to Cd, Zn or BSO on cellular GSH. H441 and A549 cells were cultured in presence of FBS for 8 or 13 days, respectively, and were then exposed for 24 h to $20 \mu\text{M}$ Cd (H441 cells), $40 \mu\text{M}$ Cd (A549 cells), $40 \mu\text{M}$ Zn (H441 and A549 cells) or 3 mM BSO (H441 and A549 cells) in the absence of FBS. "Ctrl" refers to a 24-h FBS-free period of culture without treatment. Data shown are means \pm SD estimated on 3 to 6 independent cell cultures. * Significant differences ($P \leq 0.05$) compared to control GSH level in the same cell line. ♦ Significant differences ($P \leq 0.05$) between the two cell lines.

Figure 4.5. Effect of pre-exposure to Cd or Zn on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd on a) A549 or b) H441 cells. Cells were cultured in presence of FBS for respectively 13 or 8 days and were then pre-exposed for 24 h to either 20 or $40 \mu\text{M}$ Cd or $40 \mu\text{M}$ Zn before another 24-h exposure to increasing concentrations of Cd in the culture medium. Pre-exposure and exposure were made in the absence of FBS and "Ctrl" refers to culture medium without FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 10 to 26 independent cell cultures.

Figure 4.6. Effect of pre-exposure to a), b) Cd and BSO alone or in combination, and effect of c), d) Cd and Zn on cell pretreatment with BSO on MTT activity concentration-

response curve as a function of increasing concentrations of Cd on a), c) A549 or b), d) H441 cells. Cells were cultured in presence of FBS for respectively 13 or 8 days and were then pre-exposed for 24 h to 20 or 40 μ M Cd or 3 mM BSO, alone or in combination with 20 μ M Cd or 40 μ M Zn, before another 24-h exposure to increasing concentrations of Cd in the culture medium. Pre-exposure and exposure were made in the absence of FBS and "Ctrl" refers to culture medium without FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 3 to 26 independent cell cultures.

Figure 4.7. Effect of pre-exposure to a), b) Cd and 3AT alone or in combination, and effect of c), d) Cd and Zn on cell pretreatment with 3AT on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd on a), c) A549 or b), d) H441 cells. Cells were cultured in presence of FBS for respectively 13 or 8 days and were then pre-exposed for 24 h to 20 or 40 μ M Cd, 100 mM 3AT or a combination of Cd and 3AT before another 24-h exposure to increasing concentrations of Cd in the culture medium. Pre-exposure and exposure were made in absence of FBS and "Ctrl" refers to culture medium without FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 3 to 26 independent cell cultures.

4.9 Figures

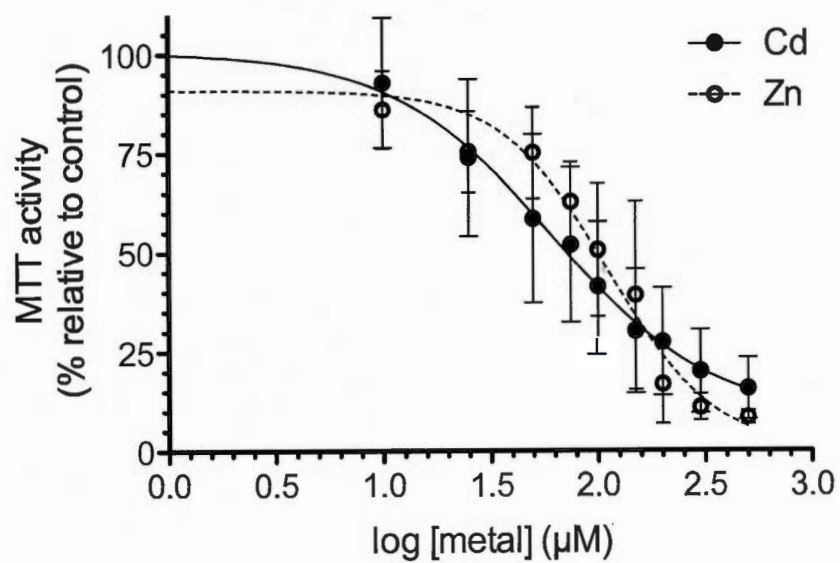
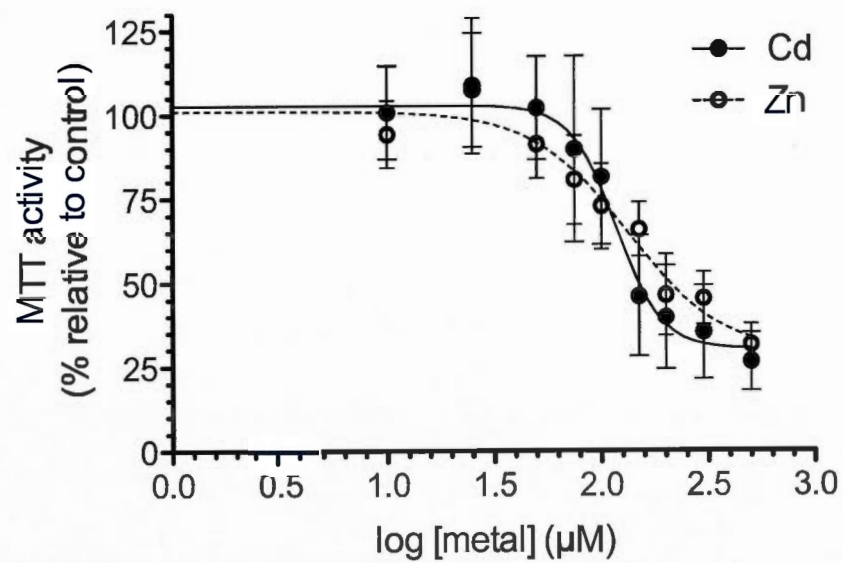
a**b**

Figure 4.1

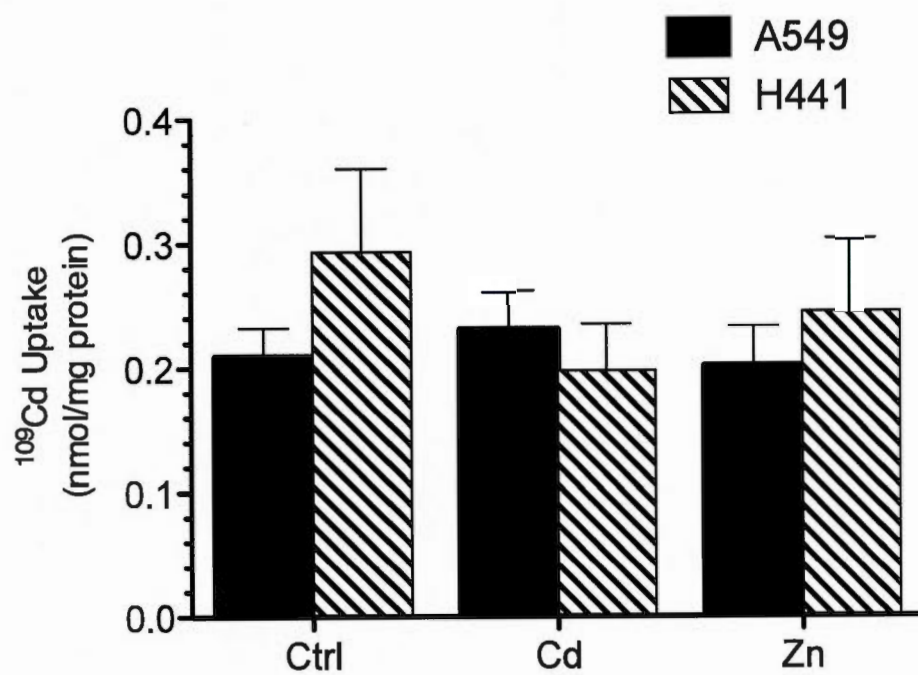


Figure 4.2

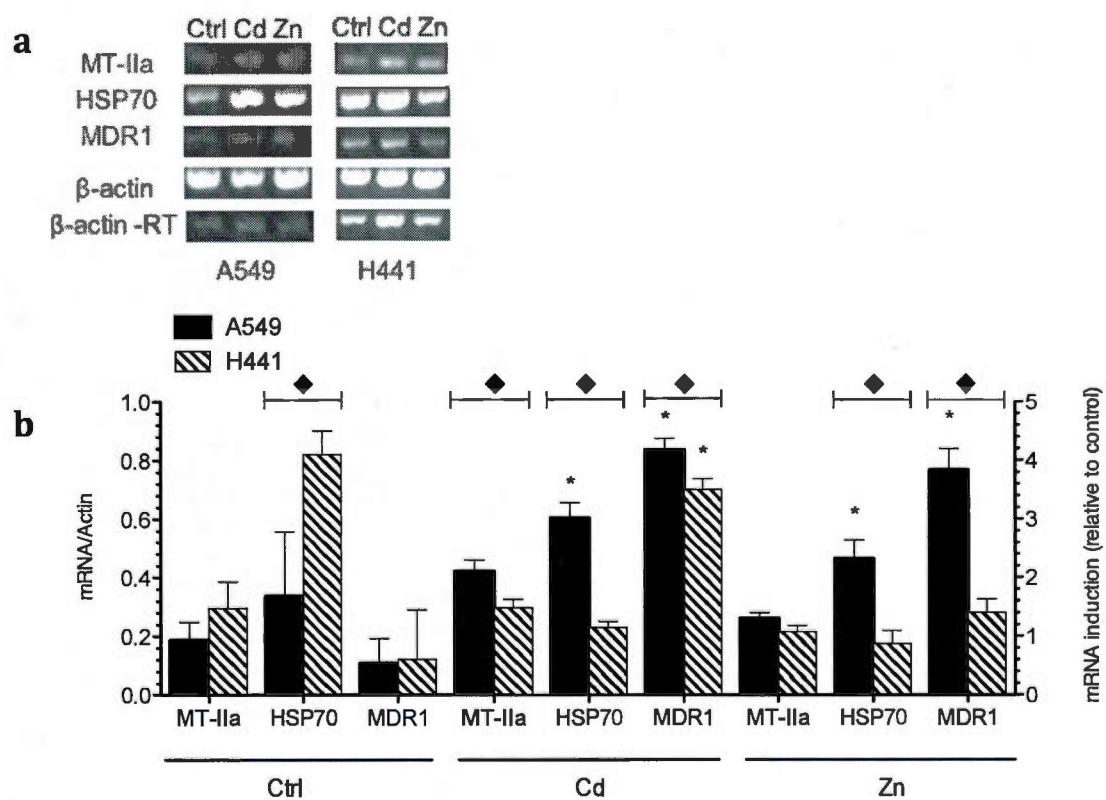


Figure 4.3

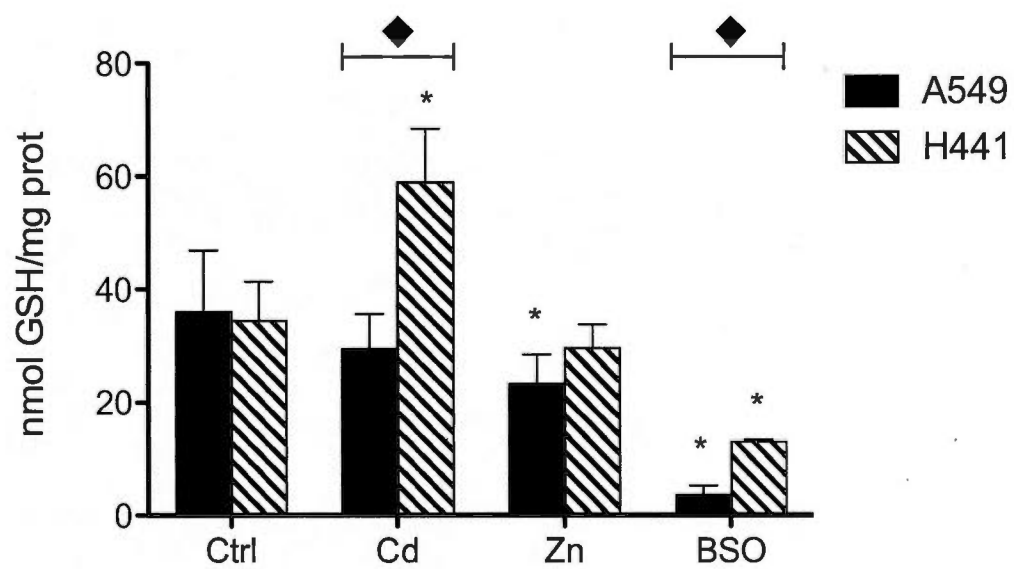


Figure 4.4

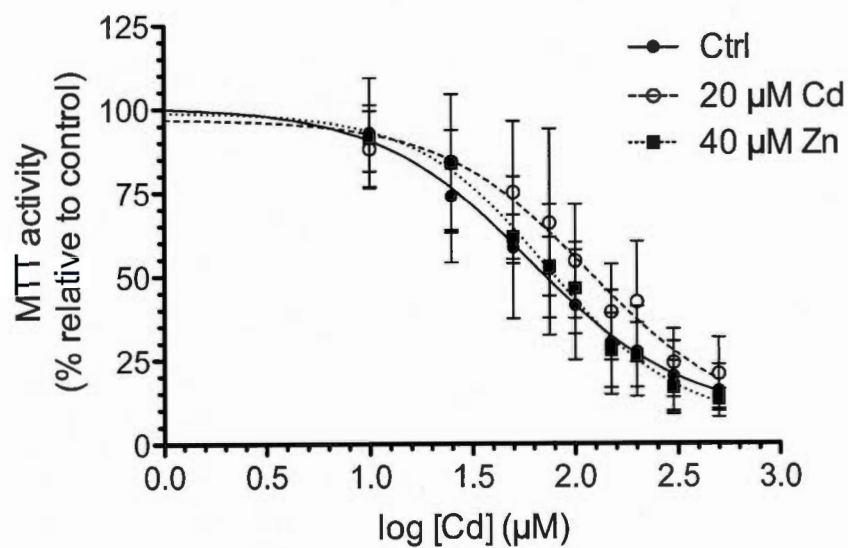
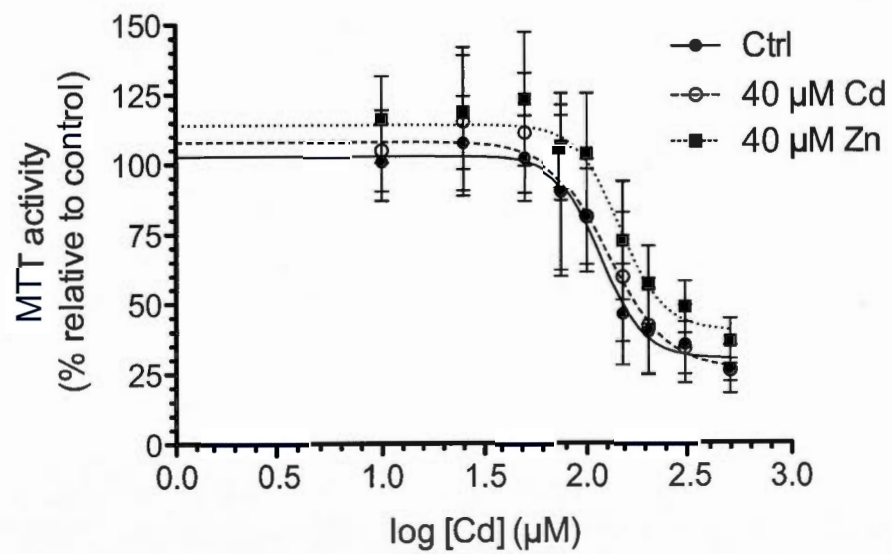
a**b**

Figure 4.5

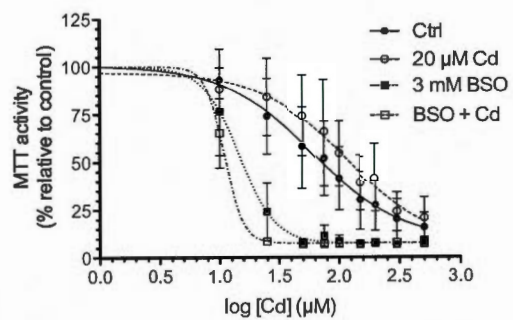
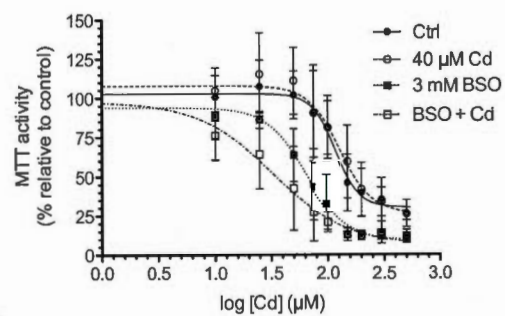
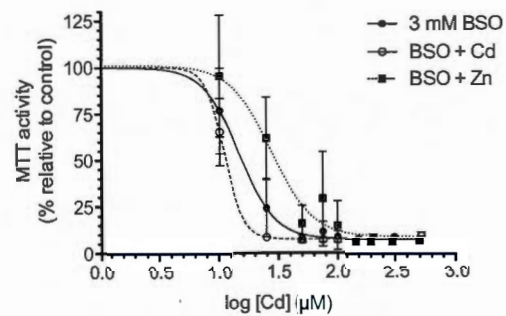
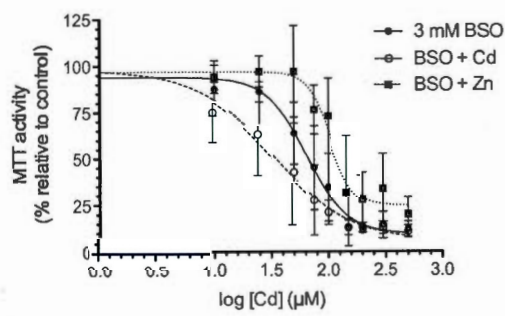
a**b****c****d**

Figure 4.6

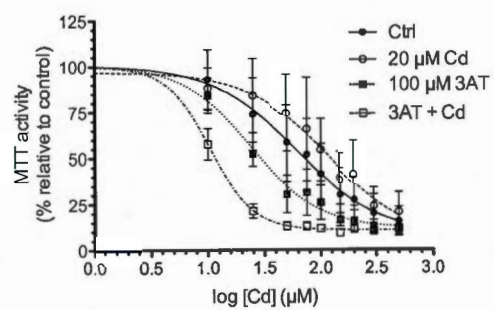
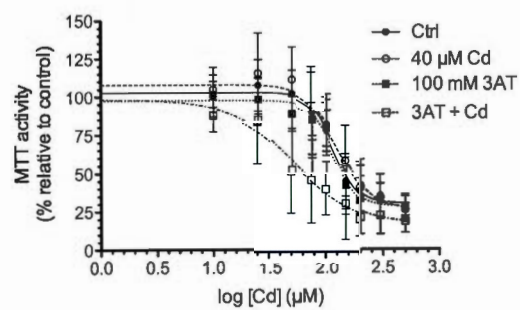
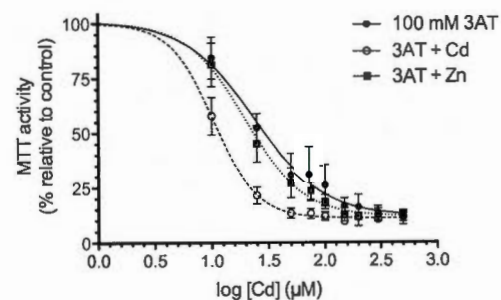
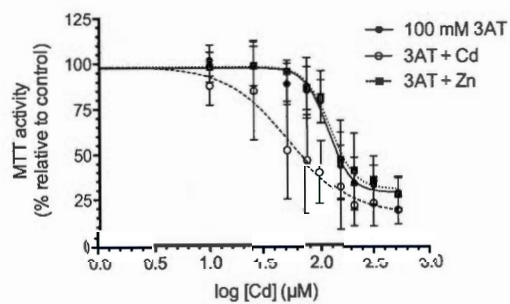
a**b****c****d**

Figure 4.7

Table 4.1. LC50 values for A549 and H441 cells following different pre-exposure treatments¹.

Pre-exposure	Exposure	A549 (μ M)	H441 (μ M)
-	Cd	61 \pm 6	118 \pm 7
-	Zn	110 \pm 22*	134 \pm 29
Cd	Cd	118 \pm 33*	128 \pm 12
Zn	Cd	74 \pm 8	145 \pm 16*
BSO	Cd	15 \pm 1*	65 \pm 5*
BSO-Cd	Cd	11 \pm 1	33 \pm 5♦
BSO-Zn	Cd	28 \pm 4♦	107 \pm 9♦
3AT	Cd	24 \pm 3*	117 \pm 8
3AT-Cd	Cd	11 \pm 1❖	52 \pm 7❖
3AT-Zn	Cd	20 \pm 1	122 \pm 6

¹ Experimental conditions and analyses were as described in the legend of Figures 1 to 7 showing the effect of various pre-exposure conditions on MTT activity concentration-response curve as a function of increasing concentrations of Cd or Zn on A549 or H441 cells. Data shown are means \pm SD estimated on 3 to 26 independent cell cultures. * Significant differences ($P \leq 0.05$) compared to control value in the same cell line. ♦ Significant differences ($P \leq 0.05$) compared to BSO in the same cell line. ❖ Significant differences ($P \leq 0.05$) compared to 3AT in the same cell line.

CONCLUSION

Pour conclure, le premier objectif, c'est-à-dire caractériser la différence de sensibilité des cellules alvéolaires et bronchiolaires face au Cd, a été atteint. Ainsi, la première hypothèse fut vérifiée puisqu'effectivement les résultats obtenus suggèrent que les deux lignées pulmonaires possèdent des capacités antioxydantes différentes, raison possible de la plus haute résistance des cellules bronchiolaires comparativement aux cellules alvéolaires. Pour davantage évaluer le pouvoir antioxydant de ces cellules, on pourrait mesurer l'activité de la SOD qui est elle aussi inhibée par le Cd (Beyersmann et Hartwig, 2008), afin de vérifier si cette activité est moins inhibée par le Cd dans les cellules bronchiolaires. De plus, le second objectif, relatif à la comparaison des capacités d'induction de résistance au Cd suivant une préexposition au Cd ou au Zn, fut lui aussi atteint. La deuxième hypothèse qui stipulait que le Zn et le Cd n'induraient pas le même type de résistance au Cd dans les deux lignées pulmonaires fut elle aussi vérifiée. En effet, les résultats obtenus ont montré que non seulement le Cd induit une résistance dans les cellules alvéolaires seulement et que le Zn induit une résistance dans les cellules bronchiolaires seulement, mais aussi que les cellules alvéolaires possèdent une capacité à développer une résistance au Cd de loin supérieure à celle des cellules bronchiolaires. Il serait intéressant de vérifier si cette résistance acquise se maintient dans le temps, en effectuant une cinétique de survie des cellules. Dans la présente étude, nous avons testé l'effet de préexpositions au Zn ou au Cd sur la tolérance croisée des cellules à ces métaux. Étudier l'effet de co-expositions de prétraitement aux deux métaux serait intéressant. Ainsi, il serait possible de vérifier si les métaux ont des effets synergiques, additifs, potentialisés ou antagonistes sur le développement de résistance au Cd. Compte tenu des connaissances disponibles sur le sujet à ce jour, il y aurait possiblement une additivité de certains effets de chaque métal sur le développement de résistance, sans toutefois avoir d'effet synergique puisque le Cd et le Zn induisent tout deux la MT par liaison au MRE, ce qui implique fort probablement une étape limitante au niveau de la synthèse. Pour vérifier ceci, des mesures de MTT pourraient être

effectuées en comparant la résistance acquise suite à une préexposition au Cd ou au Zn seul et suite à une combinaison de ces deux métaux.

Le statut redox des cellules épithéliales de poumon est un facteur déterminant de la susceptibilité cellulaire ainsi que de la tolérance aux attaques oxydatives (Rahman *et al.*, 2005). Le GSH est la molécule clé dans le maintien du statut redox cellulaire qui se définit comme étant le ratio de la concentration d'oxydants et de leurs équivalents réducteurs (Forman et Dickinson, 2003). Dans les cellules, le GSH se retrouve sous 2 formes, soit réduit (GSH) ou oxydé (GSSG), ce dernier ne représentant habituellement que 1% du « pool » total de GSH (Rahman *et al.*, 2005). Une augmentation passagère de H_2O_2 , entraîne une hausse transitoire des contenus en GSSG, menant ainsi à une diminution du ratio GSH/GSSG (Biswas et Rahman, 2009), un indicateur connu du statut redox cellulaire (Rahman *et al.*, 2005). En réponse adaptative à ce stress oxydatif, afin de rétablir le ratio GSH/GSSG, le niveau de GSH augmente soit par synthèse *de novo* à partir d'acides aminés, qui est la voie la plus importante, ou par réduction de GSSG par l'entremise de la glutathion réductase (Rahman *et al.*, 2005). Enfin, la tolérance aux expositions oxydantes ultérieures peut augmenter ou diminuer selon la modulation du GSH intracellulaire (Rahman *et al.*, 2005). Le ratio GSH/GSSG peut affecter les voies de signalisation participant dans une multitude de réponses physiologiques, incluant la prolifération cellulaire, l'expression génique modulée par le H_2O_2 et l'apoptose (Biswas et Rahman, 2009). Ainsi, la mesure de concentration seule de GSH est indicative, mais moins explicative que celle du ratio de GSH/GSSG.

Cependant, dû à des résultats incohérents avec ceux de la littérature, il a été impossible d'utiliser et de comparer les ratios de GSH/GSSG obtenus. Dans le cas des cellules alvéolaires, le ratio basal GSH/GSSG obtenu fut de 1 comparativement à la littérature rapportant plutôt des valeurs de 4.4 (Mochizuki *et al.*, 2009) et 5 (Hosakote *et al.*, 2009). Pour les cellules bronchiolaires, la situation fut similaire puisqu'un ratio GSH/GSSG de 100 est rapporté (O'Donovan *et al.*, 2000) alors que nous avons obtenu 1.5 dans la présente étude. Pourtant, divers protocoles furent utilisés et ont donné des résultats cohérents et reproductibles entre eux. Les différents protocoles de mesure ne sont donc pas à l'origine de l'importante différence entre les ratios obtenus et ceux publiés. Par contre, malgré toutes les précautions prises et indépendamment des

protocoles, on ne peut exclure la possibilité qu'il y ait eu une oxydation d'une partie du GSH lors de la préparation des échantillons qui aurait mené à une sous-estimation des rapports GSH/GSSG. Mise à part cela, toutes les manipulations effectuées se sont bien déroulées et comme nous souhaitions obtenir des résultats concluants, nous avons la plupart du temps effectué amplement de répliques.

Par ailleurs, les résultats obtenus suscitent des questions qui restent en suspend. Par exemple, nos résultats suggèrent que les cellules bronchiolaires possèdent un pouvoir antioxydant supérieur à celui des cellules alvéolaires. Comment se fait-il que dans ces cellules seul le Zn induit une résistance au Cd? La seconde hypothèse stipulait que, contrairement au Zn, le Cd induirait une résistance par l'entremise d'un déséquilibre redox. Peut-être que le Zn induit une résistance par induction de SOD (Jihen *et al.*, 2009) puisque, selon les résultats obtenus, la résistance obtenue n'est pas due à l'augmentation des ARNm de HSP70, de MT-IIa ou de MDR1 ni à une augmentation des niveaux de GSH. Cependant, les niveaux protéiques n'ont pas été mesurés, ce qui est, dans le cas de la MT, assez difficile à effectuer par immunodétection et nous n'excluons pas la possibilité d'une régulation post-transcriptionnelle (Vasconcelos *et al.*, 2002), que ce soit par les métaux eux-mêmes ou par d'autres molécules. Effectivement, le Zn est un cofacteur de la CuZn-SOD (qui dismute le $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2), tandis que le Cd entraîne une diminution de l'activité de la SOD (Jihen *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant de vérifier si les niveaux de SOD s'élèvent suivant une préexposition au Zn et non suite à une préexposition au Cd dans les cellules pulmonaires.

Aussi, comment ce fait-il que la MT-IIa n'ait pas été induite dans les cellules pulmonaires suivant une exposition au Cd ou au Zn? Ceci est particulièrement surprenant considérant que le Cd et le Zn sont connus pour induire les 10 isoformes de MT, plus spécifiquement la MT-IIa et la MT-1X (Miura et Koizumi, 2007). Une étude effectuée sur les cellules HeLa a montré des niveaux de MT impressionnants suivant une exposition à 200 μM de Zn ou 5 μM de Cd (Miura et Koizumi, 2007). Une seconde étude, faite sur les cellules HEPG2, a obtenu des augmentations d'ARNm de MT-IIa de l'ordre de 20 à 30 fois suivant une exposition de 16 h à 150 μM de Zn ou 5 μM de Cd (Perez et Cederbaum, 2003). Ainsi, dans le cas présent, la préexposition au Zn n'était peut-être

pas à une concentration assez élevée (40 μM) comparativement aux autres études, expliquant l'absence d'augmentation d'ARNm de MT-IIa. Par contre, la concentration de Cd (20 et 40 μM) semble plus que suffisante, comparativement aux autres études, pour induire la MT-IIa. Est-il possible que le temps d'exposition de 24 h ait été trop long et que les niveaux d'ARNm de MT-IIa aient eu le temps de redescendre? Effectivement, il est connu que l'expression génique de la MT-IIa atteint un maximum 6 h après l'exposition au Cd (ou Zn) dans divers types de cellules humaines (Murata *et al.*, 1999 ; Souza *et al.*, 2004). Il serait intéressant de refaire les préexpositions, toutefois, en réduisant la durée d'exposition à 6 ou 12 h par exemple.

Les ouvriers travaillant dans l'extraction et la récupération de Se ainsi que dans la production d'engrais, sont sujets aux expositions par inhalation de Se. Ces mêmes personnes sont souvent aussi exposées au Cd et au Zn par inhalation. Le Se est un élément essentiel au corps humain, mais n'est nécessaire qu'en faible quantité. Le Se est incorporé au sein d'enzymes antioxydantes (Goldhaber, 2003). Le Se est en mesure de former des complexes protéiques avec le Cd (Drasch *et al.*, 2005). De plus, le Se est en mesure d'induire la GPx (Rotruck *et al.*, 1973), qui utilise le GSH comme cofacteur afin de détoxiquer les peroxydes. Le Se protège donc du Cd absorbé, suivant inhalation. C'est pourquoi, dans une perspective où l'on souhaiterait approfondir le présent sujet en comparant l'effet d'un autre métal entraînant une résistance au Cd sans induire de stress oxydatif tel que le Zn, le Se serait un bon sujet.

Enfin, c'est grâce à des études telles que la présente que les mécanismes de toxicité du Cd seront détaillés et compris, permettant ainsi à la société de demain d'avoir les outils pour mieux évaluer le risque associé à une exposition pulmonaire au Cd chez l'humain.

RÉFÉRENCES

- Abib, R. T., K. C. Peres, A. M. Barbosa, T. V. Peres, A. Bernardes, L. M. Zimmermann, A. Quincozes-Santos, H. D. Fiedler, R. B. Leal, M. Farina et C. Gottfried. 2011. «Epigallocatechin-3-gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage». *Food Chem Toxicol*.
- Akesson, A., M. Berglund, A. Schutz, P. Bjellerup, K. Bremme et M. Vahter. 2002. «Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status». *Am J Public Health*, vol. 92, no 2, p. 284-287.
- Althaus, M., A. Pichl, W. G. Clauss, W. Seeger, M. Fronius et R. E. Morty. 2010. «Nitric Oxide Inhibits Highly Selective Sodium Channels and the Na⁺/K⁺-ATPase in H441 Cells». *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. E-Pub Ahead of Print.
- Andujar, P., L. Bensefa-Colas et A. Descatha. 2010. «Acute and chronic cadmium poisoning». *Rev Med Interne*, vol. 31, no 2, p. 107-115.
- Avissar, N., J. N. Finkelstein, S. Horowitz, J. C. Willey, E. Coy, M. W. Frampton, R. H. Watkins, P. Khullar, Y. L. Xu et H. J. Cohen. 1996. «Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells». *Am J Physiol*, vol. 270, no 2, Pt 1, p. L173-182.
- Awasthi, V., et R. J. King. 2000. «PKC, p42/p44 MAPK, and p38 MAPK are required for HGF-induced proliferation of H441 cells». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 279, no 5, p. L942-949.
- Balis, J. U., J. F. Paterson, J. E. Paciga, E. M. Haller et S. A. Shelley. 1985. «Distribution and subcellular localization of surfactant-associated glycoproteins in human lung». *Lab Invest*, vol. 52, no 6, p. 657-669.
- Bell, S. G., et B. L. Vallee. 2009. «The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link». *Chembiochem*, vol. 10, no 1, p. 55-62.
- Bellamy, W. T. 1996. «P-glycoproteins and multidrug resistance». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 36, p. 161-183.
- Bergeron, P. M., et C. Jumarie. 2006. «Reciprocal inhibition of Cd(2+) and Ca(2+) uptake in human intestinal crypt cells for voltage-independent Zn-activated pathways». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1758, no 6, p. 702-712.
- Berglund, M., A. Akesson, B. Nermell et M. Vahter. 1994. «Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake». *Environ Health Perspect*, vol. 102, no 12, p. 1058-1066.
- Bernard, A. 2008. «Cadmium & its adverse effects on human health». *Indian J Med Res*, vol. 128, no 4, p. 557-564.

- Beyersmann, D., et A. Hartwig. 2008. «Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms». *Arch Toxicol*, vol. 82, no 8, p. 493-512.
- Bingle, C. D., et J. D. Gitlin. 1993. «Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene». *Biochem J*, vol. 295 (Pt 1), p. 227-232.
- Biswas, S. K., et I. Rahman. 2009. «Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione». *Mol Aspects Med*, vol. 30, no 1-2, p. 60-76.
- Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem*, vol. 72, p. 248-254.
- Broeks, A., B. Gerrard, R. Allikmets, M. Dean et R. H. Plasterk. 1996. «Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*». *EMBO J*, vol. 15, no 22, p. 6132-6143.
- Broeks, A., H. W. Janssen, J. Calafat et R. H. Plasterk. 1995. «A P-glycoprotein protects *Caenorhabditis elegans* against natural toxins». *EMBO J*, vol. 14, no 9, p. 1858-1866.
- Brzoska, M. M., et J. Moniuszko-Jakoniuk. 1998. «The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism». *Arch Toxicol*, vol. 72, no 2, p. 63-73.
- Callaghan, A., et N. Denny. 2002. «Evidence for an interaction between p-glycoprotein and cadmium toxicity in cadmium-resistant and -susceptible strains of *Drosophila melanogaster*». *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 52, no 3, p. 211-213.
- Cardin, G. B., M. Mantha et C. Jumarie. 2009. «Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms». *Biometals*, vol. 22, no 5, p. 753-769.
- Carriere, P., M. Mantha, S. Champagne-Paradis et C. Jumarie. 2011. «Characterization of basolateral-to-apical transepithelial transport of cadmium in intestinal TC7 cell monolayers». *Biometals*.
- Casalino, E., C. Sblano et C. Landriscina. 1997. «Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation». *Arch Biochem Biophys*, vol. 346, no 2, p. 171-179.
- Chang, X. B. 2007. «A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 26, no 1, p. 15-37.
- Chao, J. I., et J. L. Yang. 2001. «Alteration of cadmium-induced mutational spectrum by catalase depletion in Chinese hamster ovary-K1 cells». *Mutat Res*, vol. 498, no 1-2, p. 7-18.

- Choi, S. J., J. M. Oh et J. H. Choy. 2009. «Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells». *J Inorg Biochem*, vol. 103, no 3, p. 463-471.
- Chuang, C. Y., T. L. Chen et R. M. Chen. 2009. «Molecular mechanisms of lipopolysaccharide-caused induction of surfactant protein-A gene expression in human alveolar epithelial A549 cells». *Toxicol Lett*, vol. 191, no 2-3, p. 132-139.
- Chuang, S. M., I. C. Wang, Y. S. Hwua et J. L. Yang. 2003. «Short-term depletion of catalase suppresses cadmium-elicited c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis: role of protein phosphatases». *Carcinogenesis*, vol. 24, no 1, p. 7-15.
- Ciencewicki, J., S. Trivedi et S. R. Kleeberger. 2008. «Oxidants and the pathogenesis of lung diseases». *J Allergy Clin Immunol*, vol. 122, no 3, p. 456-468; quiz 469-470.
- Conrad, C. C., D. T. Grabowski, C. A. Walter, M. Sabia et A. Richardson. 2000. «Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress». *Free Radic Biol Med*, vol. 28, no 3, p. 447-462.
- Conrad, C. C., C. A. Walter, A. Richardson, M. A. Hanes et D. T. Grabowski. 1997. «Cadmium toxicity and distribution in metallothionein-I and -II deficient transgenic mice». *J Toxicol Environ Health*, vol. 52, no 6, p. 527-543.
- Cross, C. E., A. van der Vliet, C. A. O'Neill, S. Louie et B. Halliwell. 1994. «Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids». *Environ Health Perspect*, vol. 102, Suppl 10, p. 185-191.
- Cui, Z. G., R. Ogawa, J. L. Piao, K. Hamazaki, L. B. Feril, Jr., A. Shimomura, T. Kondo et H. Inadera. 2011. «Molecular mechanisms involved in the adaptive response to cadmium-induced apoptosis in human myelomonocytic lymphoma U937 cells». *Toxicol In Vitro*.
- Darbre, P. D. 2006. «Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast». *J Appl Toxicol*, vol. 26, no 3, p. 191-197.
- Davis, S. R., et R. J. Cousins. 2000. «Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function». *J Nutr*, vol. 130, no 5, p. 1085-1088.
- de la Fuente, H., D. Portales-Perez, L. Baranda, F. Diaz-Barriga, V. Saavedra-Alanis, E. Layseca et R. Gonzalez-Amaro. 2002. «Effect of arsenic, cadmium and lead on the induction of apoptosis of normal human mononuclear cells». *Clin Exp Immunol*, vol. 129, no 1, p. 69-77.
- Delalande, O., H. Desvaux, E. Godat, A. Valleix, C. Junot, J. Labarre et Y. Boulard. 2010. «Cadmium-glutathione solution structures provide new insights into heavy metal detoxification». *FEBS J*, vol. 277, no 24, p. 5086-5096.
- Demple, B. 1999. «Radical ideas: genetic responses to oxidative stress». *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 26, no 1, p. 64-68.
- Drasch, G., J. Schopfer et G. N. Schrauzer. 2005. «Selenium/cadmium ratios in human prostates: indicators of prostate cancer risk of smokers and nonsmokers, and

- relevance to the cancer protective effects of selenium». *Biol Trace Elem Res*, vol. 103, no 2, p. 103-107.
- El Idrissi, Loubna. 2009. «Cytotoxicité du cadmium, du plomb et du mercure et caractérisation du transport membranaire de cadmium dans les cellules alvéolaires (A549) et bronchiolaires (H441)». Montréal, Mémoire (M. en biologie) -Université du Québec à Montréal, 2009.
- Environnement-Canada (1994). Cadmium et ses composés - LSIP1. Santé Canada. Ottawa: 106 p En ligne. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/cadmium_comp/index-fra.php>.
- Feng, T., N. Yunfeng, Z. Jinbo, Z. Zhipei, Z. Huizhong, L. Li, J. Tao et W. Yunjie. 2010. «Single immunoglobulin IL-1 receptor-related protein attenuates the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in A549 cells». *Chem Biol Interact*, vol. 183, no 3, p. 442-449.
- Forman, H. J., et D. A. Dickinson. 2003. «Oxidative signaling and glutathione synthesis». *Biofactors*, vol. 17, no 1-4, p. 1-12.
- Formigari, A., P. Irato et A. Santon. 2007. «Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects». *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, vol. 146, no 4, p. 443-459.
- Fowler, B. A. 2009. «Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 238, no 3, p. 294-300.
- Friberg, L., C. Elinder, T. Kjellstrom et G.F. Nordberg. 1985. «Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal ». In *Exposure, dose, and metabolism*, p. 240. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Goering, P. L., et C. D. Klaassen. 1983. «Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 70, no 2, p. 195-203.
- Goldhaber, S. B. 2003. «Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity». *Regul Toxicol Pharmacol*, vol. 38, no 2, p. 232-242.
- Gurel, Z., D. Ozcelik et S. Dursun. 2007. «Apoptotic rate and metallothionein levels in the tissues of cadmium- and copper-exposed rats». *Biol Trace Elem Res*, vol. 116, no 2, p. 203-217.
- Guzel, S., L. Kiziler, B. Aydemir, B. Alici, S. Ataus, A. Aksu et H. Durak. 2011. «Association of Pb, Cd, and Se Concentrations and Oxidative Damage-Related Markers in Different Grades of Prostate Carcinoma». *Biol Trace Elem Res*.
- Harley, C. B., C. R. Menon, R. A. Rachubinski et E. Nieboer. 1989. «Metallothionein mRNA and protein induction by cadmium in peripheral-blood leucocytes». *Biochem J*, vol. 262, no 3, p. 873-879.
- Hart, B. A., C. H. Lee, G. S. Shukla, A. Shukla, M. Osier, J. D. Eneman et J. F. Chiu. 1999. «Characterization of cadmium-induced apoptosis in rat lung epithelial cells:

- evidence for the participation of oxidant stress». *Toxicology*, vol. 133, no 1, p. 43-58. En ligne. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCN-3W8S1KF-3/2/1c7bab33d8f67bfa547a14319c04953>>.
- Hart, B. A., G. W. Voss et C. L. Willean. 1989. «Pulmonary tolerance to cadmium following cadmium aerosol pretreatment». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 101, no 3, p. 447-460.
- Hayashi, S., H. Sakurai, A. Hayashi, Y. Tanaka, M. Hatashita et H. Shioura. 2010. «Inhibition of NF-kappaB by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells». *Int J Mol Med*, vol. 25, no 1, p. 81-87.
- Helmbrecht, K., E. Zeise et L. Rensing. 2000. «Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review». *Cell Prolif*, vol. 33, no 6, p. 341-365.
- Hildebrand, C. E., et L. S. Cram. 1979. «Distribution of cadmium in human blood cultured in low levels of CdCl₂: accumulation of Cd in lymphocytes and preferential binding to metallothionein». *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 161, no 4, p. 438-443.
- Himeno, S., T. Yanagiya, S. Enomoto, Y. Kondo et N. Imura. 2002. «Cellular cadmium uptake mediated by the transport system for manganese». *Tohoku J Exp Med*, vol. 196, no 1, p. 43-50.
- Hissin, P. J., et R. Hilf. 1976. «A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues». *Anal Biochem*, vol. 74, no 1, p. 214-226.
- Hosakote, Y. M., T. Liu, S. M. Castro, R. P. Garofalo et A. Casola. 2009. «Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes». *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 41, no 3, p. 348-357.
- Huynh-Delerme, C., H. Huet, L. Noel, A. Frigieri et M. Kolf-Clauw. 2005. «Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long-term to cadmium». *Toxicol In Vitro*, vol. 19, no 4, p. 439-447.
- Jarup, L. 2003. «Hazards of heavy metal contamination». *Br Med Bull*, vol. 68, p. 167-182.
- Jarup, L., et A. Akesson. 2009. «Current status of cadmium as an environmental health problem». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 238, no 3, p. 201-208.
- Jarup, L., M. Berglund, C. G. Elinder, G. Nordberg et M. Vahter. 1998. «Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate». *Scand J Work Environ Health*, vol. 24 Suppl 1, p. 1-51.
- Jarup, L., A. Rogenfelt, C. G. Elinder, K. Nogawa et T. Kjellstrom. 1983. «Biological half-time of cadmium in the blood of workers after cessation of exposure». *Scand J Work Environ Health*, vol. 9, no 4, p. 327-331.
- Jihen el, H., M. Imed, H. Fatima et K. Abdelhamid. 2009. «Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress». *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 72, no 5, p. 1559-1564.

- Jin, T., Q. Kong, T. Ye, X. Wu et G. F. Nordberg. 2004. «Renal dysfunction of cadmium-exposed workers residing in a cadmium-polluted environment». *BioMetals*, vol. 17, no 5, p. 513-518. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1023/B:BIOM.0000045730.01633.45>>.
- Jin, T., G. F. Nordberg et M. Nordberg. 1986. «Uptake of cadmium in isolated kidney cells-influence of binding form and in vivo pretreatment». *J Appl Toxicol*, vol. 6, no 6, p. 397-400.
- Jin, T., M. Nordberg, W. Frech, X. Dumont, A. Bernard, T. T. Ye, Q. Kong, Z. Wang, P. Li, N. G. Lundstrom, Y. Li et G. F. Nordberg. 2002. «Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (ChinaCad)». *Biometals*, vol. 15, no 4, p. 397-410.
- Jumarie, C. 2002. «Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat A772 and the human A549 cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1564, no 2, p. 487-499.
- Kacar Kocak, M., N. Yazihan, E. Akcil, M. Bay et O. Aslan. 2010. «The effect of chronic cadmium toxicity on blood pressure and plasma viscosity». *Pathophysiol Haemost Thromb*, vol. 37, no 2-4, p. 82-87.
- Kang, Y. J., J. A. Clapper et M. D. Enger. 1989. «Enhanced cadmium cytotoxicity in A549 cells with reduced glutathione levels is due to neither enhanced cadmium accumulation nor reduced metallothionein synthesis». *Cell Biol Toxicol*, vol. 5, no 3, p. 249-259.
- Kang, Y. J., et M. D. Enger. 1987. «Effect of cellular glutathione depletion on cadmium-induced cytotoxicity in human lung carcinoma cells». *Cell Biol Toxicol*, vol. 3, no 4, p. 347-360.
- Kang, Y. J., S. T. Nuutero, J. A. Clapper, P. Jenkins et M. D. Enger. 1990. «Cellular cadmium responses in subpopulations T20 and T27 of human lung carcinoma A549 cells». *Toxicology*, vol. 61, no 2, p. 195-203.
- Kasuya, M., H. Teranishi, K. Aoshima, T. Katoh, H. Horiguchi, Y. Morikawa, M. Nishijo et K. Iwata. 1992. «Water pollution by cadmium and the onset of Itai-itai disease». *Water Science and Technology*, vol. 26, no 12, p. 149-156. En ligne. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VB5-4B66PJ5-D/2/8c68c2991c98826017b360ed2e79bea4>>.
- Kippler, M., E. C. Ekstrom, B. Lonnerdal, W. Goessler, A. Akesson, S. El Arifeen, L. A. Persson et M. Vahter. 2007. «Influence of iron and zinc status on cadmium accumulation in Bangladeshi women». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 222, no 2, p. 221-226.
- Kjellstrom, T., L. Friberg et B. Rahnster. 1979. «Mortality and cancer morbidity among cadmium-exposed workers». *Environ Health Perspect*, vol. 28, p. 199-204.

- Klaassen, C. D., et J. Liu. 1998. «Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury». *Environ Health Perspect*, vol. 106 Suppl 1, p. 297-300.
- Klaassen, C. D., J. Liu et S. Choudhuri. 1999. «Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, vol. 39, p. 267-294.
- Klaassen, C. D., J. Liu et B. A. Diwan. 2009. «Metallothionein protection of cadmium toxicity». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 238, no 3, p. 215-220.
- Kleinzeller, A., C. Dodia, A. Chander et A. B. Fisher. 1994. «Na(+)-dependent and Na(+)-independent systems of choline transport by plasma membrane vesicles of A549 cell line». *Am J Physiol*, vol. 267, no 5 Pt 1, p. C1279-1287.
- Knoflach, M., B. Messner, Y. H. Shen, S. Frotschnig, G. Liu, K. Pfaller, X. Wang, B. Matosevic, J. Willeit, S. Kiechl, G. Laufer et D. Bernhard. 2011. «Non-Toxic Cadmium Concentrations Induce Vascular Inflammation and Promote Atherosclerosis». *Circ J*.
- Kundu, S., S. Sengupta, S. Chatterjee, S. Mitra et A. Bhattacharyya. 2009. «Cadmium induces lung inflammation independent of lung cell proliferation: a molecular approach». *J Inflamm (Lond)*, vol. 6, p. 19.
- Lau, A. T., J. Zhang et J. F. Chiu. 2006. «Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 215, no 1, p. 1-8.
- Lazrak, A., A. Samanta, K. Venetsanou, P. Barbry et S. Matalon. 2000. «Modification of biophysical properties of lung epithelial Na(+) channels by dexamethasone». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 279, no 3, p. C762-770.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley et S. P. Cole. 2005. «Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 204, no 3, p. 216-237.
- Li, G. Y., M. Kim, J. H. Kim, M. O. Lee, J. H. Chung et B. H. Lee. 2008. «Gene expression profiling in human lung fibroblast following cadmium exposure». *Food Chem Toxicol*, vol. 46, no 3, p. 1131-1137.
- Li, L., et J. Kaplan. 2004. «A mitochondrial-vacuolar signaling pathway in yeast that affects iron and copper metabolism». *J Biol Chem*, vol. 279, no 32, p. 33653-33661.
- Lieber, M., B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees et G. Todaro. 1976. «A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells». *Int J Cancer*, vol. 17, no 1, p. 62-70.
- Lin, C. J., P. C. Yang, M. T. Hsu, F. H. Yew, T. Y. Liu, C. T. Shun, S. W. Tyan et T. C. Lee. 1998. «Induction of pulmonary fibrosis in organ-cultured rat lung by cadmium chloride and transforming growth factor-beta1». *Toxicology*, vol. 127, no 1-3, p. 157-166.

- Lin, Y. S., J. L. Caffrey, M. H. Chang, N. Dowling et J. W. Lin. 2010. «Cigarette smoking, cadmium exposure, and zinc intake on obstructive lung disorder». *Respir Res*, vol. 11, p. 53.
- Liu, J., R. Goyer et M.P. Waalkes. 2007a. «Toxic effects of metals». In Casarett and Doull's *Toxicology — the Basic Science of Poisons*, 7th Edition, McGraw Hill, p. 931-979.
- Liu, J., M. L. Cheng, Q. Yang, K. R. Shan, J. Shen, Y. Zhou, X. Zhang, A. L. Dill et M. P. Waalkes. 2007b. «Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China». *Environ Health Perspect*, vol. 115, no 7, p. 1101-1106.
- Liu, J., W. Qu et M. B. Kadiiska. 2009. «Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 238, no 3, p. 209-214.
- Mantha, M., L. El Idrissi, T. Leclerc-Beaulieu et C. Jumarie. 2011. «Fe- and Zn-induced inhibition of Cd uptake in human lung cell lines: speciation studies with H441 and A549 cells». *Toxicol In Vitro*.
- Martin, M. B., H. J. Voeller, E. P. Gelmann, J. Lu, E. G. Stoica, E. J. Hebert, R. Reiter, B. Singh, M. Danielsen, E. Pentecost et A. Stoica. 2002. «Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity». *Endocrinology*, vol. 143, no 1, p. 263-275.
- Mayer, M. P., et B. Bukau. 2005. «Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism». *Cell Mol Life Sci*, vol. 62, no 6, p. 670-684.
- Meister, A. 1991. «Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy». *Pharmacol Ther*, vol. 51, no 2, p. 155-194.
- Miura, N., et S. Koizumi. 2007. «[Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes]». *Yakugaku Zasshi*, vol. 127, no 4, p. 665-673.
- Mochizuki, H., M. Todokoro et H. Arakawa. 2009. «RS virus-induced inflammation and the intracellular glutathione redox state in cultured human airway epithelial cells». *Inflammation*, vol. 32, no 4, p. 252-264.
- Moffatt, P., et F. Denizeau. 1997. «Metallothionein in physiological and physiopathological processes». *Drug Metab Rev*, vol. 29, no 1-2, p. 261-307.
- Morin, Y., J.-P. Wainsten et V. Lemaire. 2006. *Larousse médical Trad. de: French, édition 2006*. Paris: Larousse, 1219 p.
- Murata, M., P. Gong, K. Suzuki et S. Koizumi. 1999. «Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes». *J Cell Physiol*, vol. 180, no 1, p. 105-113.
- Nawrot, T. S., J. A. Staessen, H. A. Roels, E. Munters, A. Cuypers, T. Richart, A. Ruttens, K. Smeets, H. Clijsters et J. Vangronsveld. 2010. «Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention». *Biometals*, vol. 23, no 5, p. 769-782.

- Nordberg, G. F. 2004. «Cadmium and health in the 21st century--historical remarks and trends for the future». *Biometals*, vol. 17, no 5, p. 485-489.
- Nordberg, G. F., T. Jin, X. Wu, J. Lu, L. Chen, L. Lei, F. Hong et M. Nordberg. 2009. «Prevalence of kidney dysfunction in humans - relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors». *Biochimie*, vol. 91, no 10, p. 1282-1285.
- Nordberg, Gunnar F., Koji Nogawa, Monica Nordberg, Lars T. Friberg, F. Nordberg Gunnar, A. Fowler Bruce, Nordberg Monica et T. Friberg Lars. 2007. «Cadmium». In *Handbook on the Toxicology of Metals (Third Edition)*, p. 445-486. Burlington: Academic Press. En ligne. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B87N0-4PP3858-1P/2/bc394b78e9389b3f613613e2343dda27>>.
- Nzengue, Y., S. M. Candeias, S. Sauvaigo, T. Douki, A. Favier, W. Rachidi et P. Guiraud. 2011. «The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: Its redox biomarkers». *J Trace Elem Med Biol*.
- O'Donovan, D. J., J. P. Katkin, T. Tamura, C. V. Smith et S. E. Welty. 2000. «Attenuation of hyperoxia-induced growth inhibition in H441 cells by gene transfer of mitochondrially targeted glutathione reductase». *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 22, no 6, p. 732-738.
- O'Reilly, M. A., T. E. Weaver, T. J. Pilot-Matias, V. K. Sarin, A. F. Gazdar et J. A. Whitsett. 1989. «In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1011, no 2-3, p. 140-148.
- Oberdorster, G. 1992. «Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds». *IARC Sci Publ*, no 118, p. 189-204.
- Ohshima, S., Y. Shimizu et T. Shibata. 1989. «Ultrastructural changes in rat Clara cells induced by bis(4-amino-3-methylcyclohexyl)methane». *J Toxicol Environ Health*, vol. 28, no 2, p. 249-255.
- OSHA (2005). *Safety and health topics: Cadmium*. Washington, DC
- Papritz, M., C. Pohl, C. Wubbeke, M. Moisch, H. Hofmann, M. I. Hermanns, H. Thiermann, C. J. Kirkpatrick et K. Kehe. 2010. «Side-specific effects by cadmium exposure: apical and basolateral treatment in a coculture model of the blood-air barrier». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 245, no 3, p. 361-369.
- Paulovich, A. G., D. P. Toczyski et L. H. Hartwell. 1997. «When checkpoints fail». *Cell*, vol. 88, no 3, p. 315-321.
- Pearson, C. A., P. C. Lamar et W. C. Prozialeck. 2003. «Effects of cadmium on E-cadherin and VE-cadherin in mouse lung». *Life Sci*, vol. 72, no 11, p. 1303-1320.

- Perez, M. J., et A. I. Cederbaum. 2003. «Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity». *Free Radic Biol Med*, vol. 34, no 4, p. 443-455.
- Pitt, B. R., M. Schwarz, E. S. Woo, E. Yee, K. Wasserloos, S. Tran, W. Weng, R. J. Mannix, S. A. Watkins, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, V. E. Kagan et J. S. Lazo. 1997. «Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury». *Am J Physiol*, vol. 273, no 4 Pt 1, p. L856-865.
- Post, C. T., K. S. Squibb, B. A. Fowler, D. E. Gardner, J. Illing et G. E. Hook. 1982. «Production of low molecular weight cadmium-binding proteins in rabbit lung following exposure to cadmium chloride». *Biochem Pharmacol*, vol. 31, no 18, p. 2969-2975.
- Prasad, A. S. 2008. «Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc». *Exp Gerontol*, vol. 43, no 5, p. 370-377.
- Prasad, A. S., F. W. Beck, D. C. Snell et O. Kucuk. 2009. «Zinc in cancer prevention». *Nutr Cancer*, vol. 61, no 6, p. 879-887.
- Rahman, I., S. K. Biswas, L. A. Jimenez, M. Torres et H. J. Forman. 2005. «Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation». *Antioxid Redox Signal*, vol. 7, no 1-2, p. 42-59.
- Rahman, I., X. Y. Li, K. Donaldson, D. J. Harrison et W. MacNee. 1995. «Glutathione homeostasis in alveolar epithelial cells in vitro and lung in vivo under oxidative stress». *Am J Physiol*, vol. 269, no 3 Pt 1, p. L285-292.
- Rahman, I., X. Y. Li, K. Donaldson, D. J. Harrison et W. MacNee. 1999. «Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells». *Am J Physiol*, vol. 277, no 6 Pt 1, p. L1067-1088.
- Rahola, T., R.-K. Aaran et J.K. Miettinen. 1972. «Half-time studies of mercury, cadmium by whole-body counting». In *Assessment of Radioactive Contamination in Man (IAEA Proceedings Series No. Sm-150/13)*, p. 553-562. New York: International Atomic Energy Agency Unipublishers.
- Reeves, P. G., et R. L. Chaney. 2008. «Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: a review». *Sci Total Environ*, vol. 398, no 1-3, p. 13-19.
- Rennolds, J., S. Butler, K. Maloney, P. N. Boyaka, I. C. Davis, D. L. Knoell, N. L. Parinandi et E. Cormet-Boyaka. 2010. «Cadmium regulates the expression of the CFTR chloride channel in human airway epithelial cells». *Toxicol Sci*, vol. 116, no 1, p. 349-358.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman et W. G. Hoekstra. 1973. «Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase». *Science*, vol. 179, no 73, p. 588-590.

- Rujano, M. A., H. H. Kampinga et F. A. Salomons. 2007. «Modulation of polyglutamine inclusion formation by the Hsp70 chaperone machine». *Exp Cell Res*, vol. 313, no 16, p. 3568-3578.
- Ryan, P. B., N. Huet et D. L. MacIntosh. 2000. «Longitudinal investigation of exposure to arsenic, cadmium, and lead in drinking water». *Environ Health Perspect*, vol. 108, no 8, p. 731-735.
- Scandalios, J. G. 2005. «Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses». *Braz J Med Biol Res*, vol. 38, no 7, p. 995-1014.
- Schmitt, C. J., J. J. Whyte, A. P. Roberts, M. L. Annis, T. W. May et D. E. Tillitt. 2007. «Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of southeastern Missouri, USA». *Ecotoxicol Environ Saf*, vol. 67, no 1, p. 31-47.
- Shaikh, Z. A., T. T. Vu et K. Zaman. 1999. «Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 154, no 3, p. 256-263.
- Shenkin, A. 1995. «Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support». *Nutrition*, vol. 11, no 1 Suppl, p. 100-105.
- Shimoda, R., W. E. Achanzar, W. Qu, T. Nagamine, H. Takagi, M. Mori et M. P. Waalkes. 2003. «Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis». *Toxicol Sci*, vol. 73, no 2, p. 294-300.
- Shin, Hye-Jin, Byung-Hoon Lee, Myeong Goo Yeo, Seon-Hee Oh, Jung-Duck Park, Kun-Koo Park, Jin-Ho Chung, Chang-Kiu Moon et Mi-Ock Lee. 2004. «Induction of orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and its role in cadmium-induced apoptosis in lung». *Carcinogenesis*, vol. 25, no 8, p. 1467-1475. En ligne. <<http://carcin.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/25/8/1467>>.
- Sies, H. 1997. «Oxidative stress: oxidants and antioxidants». *Exp Physiol*, vol. 82, no 2, p. 291-295.
- Slater, T. F., Barbara Sawyer et Ursula Strauli. 1963. «Studies on succinate-tetrazolium reductase systems: III. Points of coupling of four different tetrazolium salts III. Points of coupling of four different tetrazolium salts». *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 77, p. 383-393. En ligne. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B73G9-4888NNG-4K/2/160ff68be5cdb43b3cb2e4a072801abb>>.
- Smith, B. T. 1977. «Cell line A549: a model system for the study of alveolar type II cell function». *Am Rev Respir Dis*, vol. 115, no 2, p. 285-293.
- Somji, S., X. D. Zhou, S. H. Garrett, M. A. Sens et D. A. Sens. 2006. «Urothelial cells malignantly transformed by exposure to cadmium (Cd(+2)) and arsenite (As(+3)) have increased resistance to Cd(+2) and As(+3)-induced cell death». *Toxicol Sci*, vol. 94, no 2, p. 293-301.

- Souza, V., C. Escobar Md Mdel, L. Gomez-Quiroz, L. Bucio, E. Hernandez, E. C. Cossio et M. C. Gutierrez-Ruiz. 2004. «Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells». *Toxicology*, vol. 197, no 3, p. 213-228.
- Stephens, M. B., et K. S. Yew. 2008. «Diagnosis of chronic obstructive pulmonary disease». *Am Fam Physician*, vol. 78, no 1, p. 87-92.
- Stohs, S. J., et D. Bagchi. 1995. «Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions». *Free Radic Biol Med*, vol. 18, no 2, p. 321-336.
- Takano, Y., T. Taguchi, I. Suzuki, J. U. Balis et K. Yuri. 2002. «Cytotoxicity of heavy metals on primary cultured alveolar type II cells». *Environ Res*, vol. 89, no 2, p. 138-145.
- Taylor, J., R. DeWoskin et FK. Ennever (1999). *Toxicological profile for cadmium*. US Department of Health and Human Services. Atlanta, Georgia: 1-397 p
- Thevenod, F., J. M. Friedmann, A. D. Katsen et I. A. Hauser. 2000. «Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis». *J Biol Chem*, vol. 275, no 3, p. 1887-1896.
- Thomas, K. H., P. Meyn et N. Suttorp. 2006. «Single nucleotide polymorphism in 5'-flanking region reduces transcription of surfactant protein B gene in H441 cells». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 291, no 3, p. L386-390.
- Tobias, J. M., C. C. Lushbaugh, H. M. Patt, S. Postel, M.N. Swift et R.W. Gerard. 1946. «The pathology and therapy with 2,3-dimercaptopropanol (BAL) of experimental Cd poisoning». *J. Pharmacol. Exptl. Therap*, vol. 87 (Suppl), p. 102-118.
- Tommasini, R., R. Evers, E. Vogt, C. Mornet, G. J. Zaman, A. H. Schinkel, P. Borst et E. Martinoia. 1996. «The human multidrug resistance-associated protein functionally complements the yeast cadmium resistance factor 1». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no 13, p. 6743-6748.
- Tsien, R. W., P. Hess, E. W. McCleskey et R. L. Rosenberg. 1987. «Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block». *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, vol. 16, p. 265-290.
- Tsutsumi, R., H. Hiroi, M. Momoeda, Y. Hosokawa, F. Nakazawa, T. Yano, O. Tsutsumi et Y. Taketani. 2009. «Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke». *Fertil Steril*, vol. 91, no 4 Suppl, p. 1614-1617.
- USEPA (2001). *Cadmium and cadmium compounds. Chronic toxicity summary*: 46 p
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic et M. Mazur. 2006. «Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer». *Chem Biol Interact*, vol. 160, no 1, p. 1-40.
- Vasconcelos, M. H., S. C. Tam, J. E. Hesketh, M. Reid et J. H. Beattie. 2002. «Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein». *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 182, no 2, p. 91-97.

- Viarengo, A., G. Mancinelli, M. Pertica, R. Fabbri et M. Orunesu. 1993. «Effects of heavy metals on the Ca(2+)-ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.)». *Comp Biochem Physiol C*, vol. 106, no 3, p. 655-660.
- Waalkes, M. P. 2003. «Cadmium carcinogenesis». *Mutat Res*, vol. 533, no 1-2, p. 107-120.
- Waisberg, M., P. Joseph, B. Hale et D. Beyersmann. 2003. «Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis». *Toxicology*, vol. 192, no 2-3, p. 95-117.
- Wang, Y., J. Fang, S. S. Leonard et K. M. Rao. 2004. «Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species». *Free Radic Biol Med*, vol. 36, no 11, p. 1434-1443.
- Wilcox, A. J., D. D. Baird et C. R. Weinberg. 1999. «Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy». *N Engl J Med*, vol. 340, no 23, p. 1796-1799.
- Wilson, S. M., S. G. Brown, N. McTavish, R. P. McNeill, E. M. Husband, S. K. Inglis, R. E. Olver et M. T. Clunes. 2006. «Expression of intermediate-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel (KCNN4) in H441 human distal airway epithelial cells». *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 291, no 5, p. L957-965.
- Wirth, D., E. Christians, C. Munaut, C. Dessy, J. M. Foidart et P. Gustin. 2002. «Differential heat shock gene hsp70-1 response to toxicants revealed by in vivo study of lungs in transgenic mice». *Cell Stress Chaperones*, vol. 7, no 4, p. 387-395.
- Wong, P. S., C. F. Vogel, K. Kokosinski et F. Matsumura. 2010. «Arylhydrocarbon receptor activation in NCI-H441 cells and C57BL/6 mice: possible mechanisms for lung dysfunction». *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 42, no 2, p. 210-217.
- Wu, C., W. Zhang, K. Mai, W. Xu et X. Zhong. 2011. «Effects of dietary zinc on gene expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in hepatopancreas of abalone *Haliotis discus hannai*». *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, vol. 154, no 1, p. 1-6.
- Zhao, Y., L. Chen, S. Gao, P. Toselli, P. Stone et W. Li. 2009. «The critical role of the cellular thiol homeostasis in cadmium perturbation of the lung extracellular matrix». *Toxicology*, vol. 267, no 1-3, p. 60-69.